水稻多型性分子標幟平臺建立

徐仁浩[1]、林彥蓉[2]、郭介煒[1]、吳永培[3]*
[1]國立嘉義大學農藝系
[2]國立臺灣大學農藝系
[3]行政院農委會農業試驗所嘉義分所

摘要

本研究針對 5 個臺灣常見的秈粳稻品種與 1 個大陸秈稻品種進行 DNA 多型性分析，目的在建立高密度多型性分子標幟平臺，以供未來水稻品種鑑別、基因圖譜定位及親緣關係探討等利用。分子標幟主要選用 SSR (simple sequence repeats)、indel (insertion and deletion)與 STS (sequence-tagged site)等進行品種間或亞種間多型性之探勘。共使用 1167 個分子標幟，涵蓋水稻基因組之遺傳距離 1525.8 cM，平均密度達 1.31cM，結果發現有 736 個在 6 個品種中表現多型性，其中包含 6 個亞種內專一性標幟，多型性之比率約佔 63%；進一步檢視亞種間及亞種內之分析結果，顯示秈粳亞種間有 730 個分子標幟具多型性，平均密度達 2.09 cM，由於多型性分子標幟之密度已相當高，可供秈粳稻雜交分離子代之遺傳圖譜定位利用。在秈稻亞種內之分析結果，顯示密度平均為 4.8 cM，較之 6 個品種及亞種間的遺傳距離大。顯示由於亞種內親緣關係較近，使得多型性分子標幟之偵測在秈稻亞種內較少，惟分子標幟密度已相當高，應已足供秈稻雜交後代遺傳圖譜定位分析利用。至於粳稻間的多型性分子標幟之平均為 13.27 cM，顯示由於粳稻因親緣接近，造成遺傳歧異度相對較低，尤其是多型性分子標幟分佈並不均勻。未來有待以更多分子標幟在多型性缺乏之染色體區域進行篩選以提高分子標幟密度，擴大資料的應用價值，並大幅降低多型性分子標幟篩選上所需投注之資源，提高國內相關研究之效率。

關鍵詞：水稻、分子標幟平臺、多型性、分子標幟輔助選種。

* 通信作者, wuypei@dns.caes.gov.tw
投稿日期：2012 年 6 月 23 日
接受日期：2012 年 7 月 19 日
作物、環境與生物資訊 9:137-159 (2012)
Crop, Environment & Bioinformatics 9:137-159 (2012)
189 Chung-Cheng Rd., Wufeng, Taichung 41362, Taiwan ROC

Establishing the Platform of Polymorphic Markers for Rice

Jen-Hao Hsu[1], Yann-Rong Lin[2], Chieh-Wei Kuo[1] and Yong-Pei Wu[3]*

[1] Department of Agronomy, National Chiayi University, Chiayi 60004, Taiwan ROC
[2] Department of Agronomy, National Taiwan University, Taipei 10617, Taiwan ROC
[3] Chiayi Agricultural Experiment Station, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi 60014, Taiwan ROC

ABSTRACT

In order to establish the platform of high-density polymorphic markers in rice for application on variety identification, linkage mapping of gene (s), and phylogenetic analysis, polymorphic DNA fragments among 5 common *indica* and *japonica* varieties from Taiwan and one *indica* variety from Mainland China were investigated in this study. Three different kinds of molecular markers, SSR (simple sequence repeats), indel (insertion and deletion) and STS (sequencei-tagged site), were used for polymorphic markers mining among varieties and between sub-species. A total of 1,167 markers were selected in this

study, covered 1525.8 cM on 12 chromosomes, with an average of 1.31 cM. There were 736 (63%) markers exhibiting polymorphism among 6 varieties, containing 6 inter subspieces specific polymorphism markers. Out of them, 730 polymorphic markers were uncovered between *indica* and *japonica* subspecies, with an average of 2.09 cM. This distance is relative dense and sufficient for linkage analysis of genes segregating in populations derived from crosses of *indica* and *japonica* varieties. The average distance of polymorphic markers among *indica* varieties was 4.8 cM, larger than those of among 6 varieties and between two subspecies, indicating a close genetic relationship and a fewer numbers of polymorphic markers. However, the polymorphic marker density was high enough for genetic linkage analyses of *indica*/ *indica* crosses. The average distance of polymorphic markers among *japonica* varieties was 13.27 cM, indicating that the genetic relationship of *japonica* varieties was very close and the genetic diversity of *japonica* varieties was relatively narrow so that polymorphic markers unevenly distributed in some chromosome segments. In the future works, regions with insufficient polymorphic markers will be explored and density of polymorphic markers will be extended simultaneously to provide the needed marker information for improving efficiency of the related studies.

Key words: Rice, Molecular marker platform, Polymorphism, Marker-assisted selection.

前言

水稻(*Oryza sativa* L.)為全球最重要的糧食作物之一，全世界超過 50%人口的主要食物來源，亦為臺灣地區人民的主食，其發展攸關人類糧食的穩定供給。水稻的改良在目前慣行育種上，大都藉由雜交技術將不同遺傳背景水稻基因體進行重新組合，由分離子代的外表型性狀表現加以評估選拔。然因許多水稻重要性狀，如產量、品質、抗生物逆境與非生物逆境皆受數量性狀基因座(quantitative trait loci; QTLs) 所控制，且容易受環境因素所影響，這些由數量基因控制的性狀常無法經由植株外表型表現來鑑定(Collard *et al*. 2005)，導致選拔效率偏低。此種限制自 1980 年分子標幟開始發展後，開啟農藝界新分子育種的領域(Rafalski and Tingey 1993)，透過遺傳連鎖圖譜(genetic linkage map)的建立，利用分子標幟找出與目標性狀緊密連鎖的基因。經由據圖選殖(map-based cloning)等技術，不僅提供解析 QTL 的機會(Paterson *et al*. 1988)，也展露掌控數量性狀的新契機。尤其是利用分子標幟輔助育種 (marker-assisted selection; MAS)，透過與性狀(基因)緊密連鎖的分子標幟，將基因準確的轉移至優良栽培種內(Ribaut and Hoisington 1998)。相較於傳統的雜交育種，MAS 更能提升選拔效率及加速育種過程，是相當值得信賴的技術(Collard *et al*. 2005)。然而 QTL 圖譜的建立和 MAS 均奠基於分子標幟之建構技術，故建構充分的多型性分子標幟，自然成為水稻分子育種領域的重要基礎。

由於 DNA 分子標幟不會受環境因素影響，能更有效率的評估遺傳差異，因此利用與性狀緊密連鎖的分子標幟，可直接提供目標基因之選拔。其於水稻秧苗期即可進行基因型鑑定，未如慣行育種須待幼苗生長至目標性狀出現後，再根據外表型表現進行選拔，因而明顯提升效率。另外，由於分子標幟可判別異型結合之後裔，因此選育之標的族群種植株數可相對減少，且因不需基因型之分離測定，更可縮短一個世代的試驗時間(Lin *et al*. 2008)。居於分子標幟具有多項優點，Botstein *et al*. (1980) 開始利用限制片段長度多型性 RFLP (restriction fragment length polymorphism)作為遺傳標幟，而 McCouch *et al*. (1988)更將分子標幟首度應用於水稻遺傳連鎖圖譜研究上，此後許多分子標幟系統便開始陸續地發展，如 DNA 逢機增幅多型性 RAPD (random amplified polymorphic DNA; Williams *et al*. 1990)和擴增片段長度多型性 AFLP (amplified fragment length polymorphism; Vos *et al*. 1995)。在親緣關係

鑑定研究中，有廣為學者所應用之高度多型性簡單重複序列 SSR (simple sequence repeat)標幟(Akkaya *et al*. 1992)。至於各物種中數量最密集的分子標幟，單一核苷酸多型性 SNP (Single Nucleotide Polymorphism)標幟則於 2001 年開始發展與建立(Kruglyak and Nickerson 2001)。由於水稻在減數分裂過程中，DNA 複製時聚合酶發生失誤(DNA slippage) 或同源染色體的不對稱互換 (unequal crossing over)，結果會造成個體間簡單重複序列次數不同。因為水稻序列包含了大量的核苷酸重複性排列現象，故擴增特定簡單重複序列的 SSR 標幟於稻種間具有相當高度多型性的機率，適用於進行遺傳歧異度分析工作。另外 SSR 具共顯性 (co-dominant)、易於探測且能利用 PCR (polymerase chain reaction)技術之特性，能有效率且廣泛應用於圖譜建立、分子輔助育種與定位選殖 (Positional cloning)的研究工作(McCouch *et al*. 1997)。

至於插入與缺失(indel)在秈稉稻間為分布密度第二高之分子標幟，此標幟係基於已解序完成之稉稻品種日本晴(Nipponbare; IRGSP 2005)與秈稻品種 93-11 序列(Yu *et al*. 2002)，經序列比對後具插入與缺失差異之位置後，再設計專一性引子將具多型性差異之片段擴增出來。除了增加多型性標幟數量外，分辨秈稉稻差異上，indel 相較於利用外表型性狀進行秈稉稻鑑定工作之傳統方法，具有準確、快速且有效率之優點(Lu *et al*. 2009)。根據 Shen *et al*. (2004)建立的 DNA 多型性資料庫，其包括 1,703,176 個 SNPs 與 479,406 個 indels，平均約每 953 bp 即包含一個插入或缺失之序列差異，僅次於 SNP 的密度(每 268 bp 即有一個單一核苷酸差異)。因此，利用 indel 亦能找到大量秈稉稻間的多型性分子標幟，有利於連鎖圖譜的分析工作。Olson *et al*. (1989)提出標幟序列點 STS 概念，STS 是一種辨識及複製已知圖譜位置特定 DNA 序列標幟，能提供特定基因片段資訊。STS 能以各種分子標幟進行擴增，諸如 SSR、切割增幅多型性序列 CAPs (cleaved amplified polymorphic sequences) 與簡單序列重複區間 ISSR (inter-simple sequence repeat)等。這些分子標幟雖可廣泛地應用於分子生物研究中，惟在找尋多型性分子標幟的過程中，往往需耗費大量的研究資金與時間。先行建立密集且具多型性的分子標幟平臺，將有助於縮減不必要的人力、物力的投入，有效增進整體研究效率。

水稻育種是藉由基因結合、分離及重組等操縱來創新種質資源，尤其是利用秈稉雜交產生之豐富基因重組(Lu *et al*. 2009)，可建構出完整之水稻連鎖圖譜以供研究，雖然秈稉間之遺傳歧異度大，且具有豐富多型性分子標幟，但其雜交後所產生之子代很容易發生高度不稔性(Ali *et al*. 2010)，秈稉後代分離族群也易發生分離偏差 (segregation distortion) 影響連鎖分析(Wu *et al*. 2010)。基此，了解秈稉稻種間親緣關係之遠近，以此選擇適當的雜交組合是圖譜定位選殖上相當重要的工作。其可利用群體親緣關係先行估算遺傳距離遠近，基於現代稻種演化速度相近，可推測核苷酸置換速率與親緣遠近約成正比之原理，透過以遺傳距離(genetic distance) 或最大簡約法 (maximum parsimony)等親緣關係分析估算出親緣遠近，利用親緣關係挑選出適當的親本，據以建立合適的圖譜定位族群。如 Huang *et al*. (2010)進行 36 個稻種的親緣關係鑑定，發現利用分子標幟建立的遺傳距離矩陣(genetic distance matrix)和親緣關係樹狀圖呈現高度相關性，而此種親緣關係遠近資訊可於多型性分子標幟分析平臺之建置時應用。

為建立國內水稻圖譜定位選殖於多型性分子標幟之需求，本研究主要利用 6 個水稻品種為材料，進行亞種間與亞種內 SSR、indel 與少數 STS 多型性探勘，期開發高密度多型性分子標幟以供利用。其中，在秈稉間之多型性標幟密度以 1-2.5 cM 距離有一分子

標幟為目標，並於過程中找到許多秈稻間和稉稻間之多型性的標幟，供未來進一步進行雜交後代遺傳圖譜建立的需求，以降低亞種間遺傳偏離與子代高度不穩性等干擾因素，有效提升據圖選殖之效率。最後再分析品種間的親緣關係，提供作水稻分生研究與雜交組合選擇的資訊。

材料與方法

一、試驗材料

試驗以 5 個臺灣常見的秈稉稻品種與 1 個大陸引進之秈稻耐旱品種為材料，即臺稉 9 號、臺農 67 號、臺稉 8 號、臺中秈 10 號、臺中秈 17 號與旱育 15 號等。其中臺稉 9 號、臺農 67 號與臺稉 8 號為稉稻品種(*O. sativa ssp. japonica*)，而臺中秈 10 號、臺中秈 17 號與旱育 15 號則為秈稻品種(*O. sativa ssp. indica*)。臺農 67 號為 70 年代臺灣地區主要栽培品種，具穩定高產潛力且適應性廣，同時為水稻遺傳及育種研究上常用的品種；而臺稉 8 號與臺稉 9 號皆為米粒外觀優良或食味佳之優良品種，為雜交育種上常用之親本；臺中秈 10 號與臺中秈 17 號分別為秈稻軟秈、硬秈稻的主要栽培品種，可作為建立秈稉雜交分離群體之親本，或供育種與遺傳分析之用途；旱育 15 號為大陸引進材料，除具農藝特性優良外，依據國際水稻研究所訂定之水稻乾旱分級標準鑑別 (Standard Evaluation System: IRRI 1996)，具有全生育期均表現 3 級左右之耐旱特性，可於育種時扮演提供耐旱特性的貢獻親(Luo 2010)。

二、水稻基因體 DNA 之萃取

水稻葉片基因體 DNA (genomic DNA) 萃取方式修改自 Benzyl Chloride 法 (Kazuhiro *et al.* 1998)，先取約 5 cm 鮮嫩葉片放入 2.0 mL 圓底離心管，並置入一顆鋼珠，再以組織研磨機 TissueLyser II (Qiagen, German) 設定頻率至 30 Hz 震盪 2 min 研碎葉片。再加入 300 μL 之 Solution I (100 mM Tris-HCl， pH 9.0；40 mM EDTA，pH 8.0；1.67 % SDS) 和 150 μL 之 benzyl chloride (Acros, USA) 後，置於 50℃水浴中 15 min；其後加入 150 μL 之 3 M NaOAc，緩慢搖晃使其均勻混合。在 4℃下以 15,000 rpm (21,380 × g)離心 15 min，取上清液至新的離心管，加入 800 μL 之 100%乙醇，緩慢混勻。以 15,000 rpm (21380 × g) 離心 10 min 沉降 DNA，留下 DNA pellet，並加入 500 μL 之 70%乙醇，靜置 5 min，清洗鹽類。去除乙醇後，風乾 DNA。最後加入 100 μL 之 TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl，pH 8.0；1 mM EDTA，pH 8.0) 溶解 DNA。

三、分子標幟來源

本研究主要使用 SSR 分子標幟來進行秈稉稻間多型性之探勘，由於水稻染色體中含有大量的簡單重複序列，可期望在不同品種間存在 SSR 多型性。故 SSR 分子標幟可利用專一性引子，將該片段擴增並以電泳系統將片段加以分離，如此即可偵測品種間具多型性的分子標幟。至於 SSR 分子標幟來源主要係根據水稻分子標幟資料庫網站，Gramene (http://www.gramene.org/Markers/microsat/)已公布的 SSR 分子標幟序列。經測試並進行多型性分子標幟基因型分析，若發現染色體區域內之分子標幟多型性不足或 SSR 分子標幟數量不足時，即自行設計數個 indel 分子標幟補足多型性缺乏之區間。而 indel 分子標幟，則係利用已解序之稉稻品種日本晴和大陸秈稻品種 93-11 為基礎，經比對兩品種間染色體序列在插入、缺失片段上之差異後，再設計專一性引子擴增 DNA 片段，其後再測試所合成之 indel 分子標幟之多型性。一般而言，indel 分子標幟在其他水稻秈稉稻品種間亦存在高度的多型性可供利用。研究中尚有使用少數的 STS 分子標幟，來源為水稻分子標幟資料庫網站，RGP (http://rgp.dna.affrc.go.jp/E/publicdata/caps/ index.html)已公布的 STS 分子標幟資

訊。所有多型性分子標幟使用 RAP-DB (The Rice Annotation Project Database) 網站 (http://rapdb.dna.affrc.go.jp) IRGSP 1.0 版搜尋遺傳圖譜的位置，再將結果利用 GGT 2.0: Graphical Geno Typing / 2008 edition 軟體將 12 條染色體之多型性分子標幟以遺傳圖譜的方式繪出。

四、PCR 反應與電泳分析

PCR 反應總體積為 10 µL，其包含約 20 ng 的 DNA、0.2 µM 的引子、0.5 unit 的 T*aq* DNA Polymerase Master Mix Red (Ampliqon, Denmark)，使用核酸增值儀 Labcycler 96 (Sensoquest, German)進行反應，PCR 流程設定先 94℃ 為 2 min，一個循環；94℃為 30 s，55℃為 20 s，72℃為 30 s，共 35 個循環；72℃為 2 min，一個循環；最後結束在 20℃。由於所挑選使用之分子標幟預測片段多在 100-300 bp 之間，故將 PCR 擴增之 DNA 產物以 6%的 1.5 mm non-SDS PAGE (non-SDS polyacrylamide gel electrophoresis)進行 PCR 產物的分離。膠體製作使用四片注膠器 GCC-204-33 (C.B.S. Scientific®, USA)，加入 110 mL 的 1 x TBE (Amresco®, USA)、77 mL 的逆滲透 RO water、33 mL 的 19:1 ACRYL/BIS™ (Amresco®, USA)、0.1% APS (Amresco®，USA)，並於最後添加 176 µL 的 TEMED (Amresco®, USA) 催化游離基電子的傳遞，靜置約 1 h 即可充分凝膠。電泳槽部分使用超寬型雙面直立式迷你電泳裝置 MGV-202-33 (C.B.S. Scientific®，CA)，一個電泳槽可一次進行兩片(每片 102 個 well)膠體電泳，電泳緩衝液使用 0.5 x TBE。為了記錄 DNA 片段大小，每片膠以 1 µL 的 20-bp DNA Ladder (Bayou Biolabs®, LA)為標幟，各 well 均加入 1 µL 的各樣品 PCR 產物，並使用 100 V 進行 60 h 電泳，即可適當地分離長度 100-300 bp 的 DNA 片段。電泳結束後將膠片卸下，置於含 10 µL SYBR® Safe DNA gel stain (Life technologies®, USA) 的 200 mL RO water 中，輕搖 5 min 進行膠片外染，再放到暗箱中以 UV 光(365 nm)使 DNA 條帶顯影並照相記錄。

五、分子標幟之多型性判讀

6 個品種水稻染色體組 DNA 經 PCR 反應擴增分子標幟後，其產物經過電泳分析後即可判讀分子標幟在分子量上之差異。片段之差異性經由人工分析判讀，當品種間分子量無差異可能為相同之等位基因(allele)，則標記為無多型性；而當分子量有差異時表示為不同的等位基因、為多型性，並將多型性標幟區分為秈稉、稉稉、秈秈品種間之多型性。大部分品種在這些分子標幟都只有一個條帶，但有少部分會出現兩個條帶，表示該品種在此分子標幟在兩個位置均會擴增出 DNA 片段。當分子標幟擴增出任何片段時，再針對該分子標幟進行最適黏合溫度測試，確認是否因過高的黏合溫度導致引子與核苷酸模版無法配對，致使 PCR 反應無法有效進行。

結果

一、多型性分子標幟探勘

架構高密度多型性 SSR、indel、STS 分子標幟平臺時，由於多型性分子標幟間等位基因之 DNA 片段大小差異不大，差異 5 bp 以下之分子標幟解析，以 PAGE 系統較為合適。PAGE 電泳的結果如 Fig. 1 所示，利用 6% PAGE 電泳系統進行 DNA 擴增片段分析，能有效的分離 100-300 bp 大小的 DNA 片段，其單一膠片之一半即可同時進行 6 個水稻品種之 8 個分子標幟 DNA 擴增片段分析。如 Fig. 1，電泳圖中最左與最右條帶為 20 bp DNA ladder，其餘為本次試驗六個水稻品種之電泳結果，由左至右(1-6)分別為臺稉九號、臺農 67 號、旱育 15 號、臺中秈 10 號、臺中秈 17 號與臺稉 8 號，使用的 8 個分子標幟由左至右分別為 CH0104、STS326、

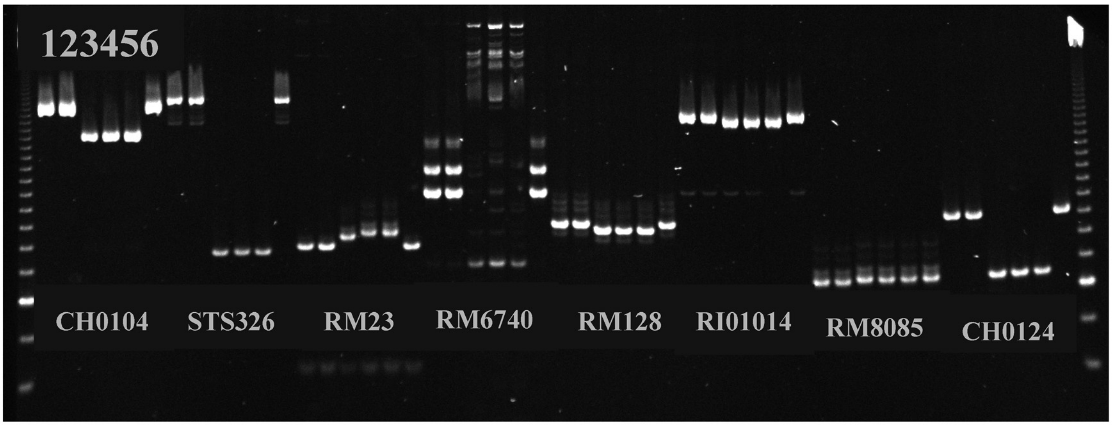


Fig. 1. The polymorphic survey of 8 markers by 6% PAGE using PAGE electrophoresis system. The leftmost and rightmost lanes are DNA molecular markers, 20-base pair ladder. The six rice varieties, Taikeng 9, Tainung 67, Hang-Yu 15, Taichung Sen 10, Taichung Sen 17 and Taikeng 8, respectively, are arranged from left to right consequently genotyped by CH0104, STS326, RM23, RM6740, RM128, RI01014, RM8085 and CH0124.

RM23、RM6740、RM128、RI01014、RM8085 與 CH0124。以分子標幟 RM23 為例，將擴增 DNA 條帶與 20 bp DNA ladder 進行人工比對，三個稉稻品種擴增出的分子量皆為 138 bp，而三個秈稻如旱育 15 號、臺中秈 10 號、臺中秈 17 號擴增出的分子量分別為 146、150 與 150 bp，由於 PAGE 解析度較洋菜膠電泳高，可區分分子量在 200bp 以下且大小差距 4-5 bp 之兩樣本多型性，藉此旱育 15 號與兩秈稻之條帶大小差異可被區分出來，表示旱育 15 號和臺中秈 10 號與臺中秈 17 號兩者皆有多型性，且秈稉稻間也具有多型性。另外，分子標幟 RI01014 於此六個品種所擴增的條帶分別為 340、340、320、320、320 與 340，表示秈稉稻間具有多型性，也指出即便條帶大小超過 300 bp 以上，以聚丙烯醯胺凝膠進行 DNA 電泳後，仍可明顯區分出 10-20 bp 的差異。

二、多型性分子標幟之探勘結果

本次試驗共使用 1,167 個分子標幟，其染色體總覆蓋之遺傳距離為 1,525.8 cM，兩個分子標幟間之平均間隔為 1.31 cM。第一至第十二條染色體分別使用 179、109、110、98、110、84、61、102、50、53、58 與 153 個之 SSR、indel 與 STS 等分子標幟，其中以第一條染色體使用 179 個分子標幟為最多，總覆蓋之遺傳距離為 181.8 cM，且兩個分子標幟間之平均遺傳距離為 1.02 cM。而第九條染色體使用的分子標幟量最少，僅 50 個分子標幟，總覆蓋之遺傳距離為 93.5 cM，兩個分子標幟間之平均遺傳距離為 1.87 cM；唯就分子標幟密度而言，以第十二條染色體之平均遺傳距離為 0.71 cM 最高，而以第十一條染色體之平均遺傳距離為 2.03 cM 最低，其餘染色體的分子標幟間之平均遺傳距離皆低於 2.0 cM (Table 1)。

6 個水稻品種多型性分子標幟探勘結果分成三大類，分別就秈稉稻、秈稻和稉稻間之多型性分子標幟數量，並進行涵蓋密度之解析。為了解不同分子標幟系統於 6 個水稻品種間多型性出現的實際差異，進一步整理了 6 個水稻品種間不同多型性分子標幟探勘結果分析如 Tables 2、3、4 所示，此三個表格分別為秈稉稻、秈稻與稉稻間等不同分子標幟多型性的表現差異之摘要結果。其中由 Table 2 可知有 730 個分子標幟在秈稉稻間表

Table 1. The summary of markers used in polymorphic survey on six rice varieties.

Chromosome	Marker numbers				The coverage of all markers (cM)	The average of genetic distance (cM)
	SSR	indel	STS	Total		
1	91	74	14	179	181.8	1.02
2	65	30	14	109	157.9	1.45
3	73	22	15	110	166.4	1.51
4	47	45	6	98	129.6	1.32
5	59	42	9	110	122.3	1.11
6	39	36	9	84	124.4	1.48
7	34	19	8	61	118.6	1.94
8	35	57	10	102	120.4	1.18
9	18	25	7	50	93.5	1.87
10	31	18	4	53	83.8	1.58
11	28	24	6	58	117.9	2.03
12	121	27	5	153	109.2	0.71
Total	641	419	107	1167	1525.8	1.31

Table 2. The summary of polymorphic markers between *indica* and *japonica* subspecies in rice.

Chromosome	The number of polymorphic markers /Total markers				The coverage of all markers (cM)	The average distance of polymorphic markers (cM)	The percentage of polymorphic marker (%)
	SSR	indel	STS	Subtotal			
1	71/91	38/74	5/14	114/179	181.8	1.59	63.7
2	59/65	15/30	4/14	78/109	157.9	2.02	71.6
3	61/73	10/22	9/15	80/110	166.4	2.08	72.7
4	28/47	22/45	4/6	54/98	129.6	2.40	55.1
5	44/59	17/42	5/9	66/110	122.3	1.85	60.0
6	29/39	16/36	4/9	49/84	124.4	2.54	58.3
7	25/34	12/19	4/8	41/61	118.6	2.89	67.2
8	21/35	19/57	3/10	43/102	120.4	2.80	42.2
9	16/18	18/25	5/7	39/50	93.5	2.40	78.0
10	25/31	12/18	1/4	38/53	83.8	2.21	71.7
11	22/28	16/24	3/6	41/58	117.9	2.88	70.7
12	66/121	19/27	2/5	87/153	109.2	1.26	56.9
Total	467/641	214/419	49/107	730/1167	1525.8	2.09	62.6
Percent polymorphic marker (%)	72.9	51.1	45.8				

現出多型性，分子標幟間平均遺傳距離為 2.09 cM，以第一、二、三、五及十二條染色體多型性分子標幟之平均遺傳距離低於 2.09 cM；而第一條染色體具有最多之多型性分子標幟，共計有 114 個，包括 71 個 SSR 標幟、38 個 indel 標幟與 5 個 STS 標幟，染色體之覆蓋遺傳距離為 181.8 cM，兩多型性分子標幟間之平均遺傳距離為 1.59 cM；而第十條染色體呈現之多型性標幟最少，共有 38 個，包括 25 個 SSR 標幟、12 個 indel 標幟與 1 個 STS 標幟，染色體之覆蓋遺傳距離為 83.8 cM，兩分子標幟間之平均遺傳距離則為 2.21cM。進一步檢視各染色體分子標幟表現之多型性數量，換算具多型性分子標幟出現之比率，結果

Table 3. The summary of polymorphic markers among three *indica* rice varieties.

Chromosome	The number of polymorphic markers /Total markers				The coverage of all markers (cM)	The average distance of polymorphic markers (cM)	The percentage of polymorphic marker (%)
	SSR	indel	STS	Subtotal			
1	26/91	7/74	1/14	34/179	181.8	5.35	19.0
2	32/65	2/30	1/14	35/109	157.9	4.51	32.1
3	33/73	2/22	2/15	37/110	166.4	4.50	33.6
4	18/47	14/45	3/6	35/98	129.6	3.70	35.7
5	18/59	7/42	1/9	26/110	122.3	4.70	23.6
6	16/39	5/36	1/9	22/84	124.4	5.65	26.2
7	13/34	3/19	1/8	17/61	118.6	6.98	27.9
8	11/35	4/57	1/10	16/102	120.4	7.53	15.7
9	5/18	4/25	0/7	9/50	93.5	10.39	18.0
10	15/31	6/18	0/4	21/53	83.8	3.99	39.6
11	13/28	10/24	2/6	25/58	117.9	4.72	43.1
12	36/121	3/27	2/5	41/153	109.2	2.66	26.8
Total	236/641	67/419	15/107	318/1167	1525.8	4.80	27.2
Percent polymorphic marker (%)	36.8	16.0	14.0				

Table 4. The summary of polymorphic markers among three *japonica* rice varieties.

Chromosome	The number of polymorphic markers /Total markers				The coverage of all markers (cM)	The average distance of polymorphic markers (cM)	The percentage of polymorphic marker (%)
	SSR	indel	STS	Subtotal			
1	7/91	0/74	1/14	8/179	181.8	22.73	4.5
2	6/65	2/30	2/14	10/109	157.9	15.79	9.2
3	10/73	0/22	2/15	12/110	166.4	13.87	10.9
4	3/47	7/45	0/6	10/98	129.6	12.96	10.2
5	4/59	2/42	0/9	6/110	122.3	20.38	5.5
6	6/39	7/36	0/9	13/84	124.4	9.57	15.5
7	6/34	3/19	1/8	10/61	118.6	11.86	16.4
8	5/35	3/57	0/10	8/102	120.4	15.05	7.8
9	2/18	1/25	0/7	3/50	93.5	31.17	6.0
10	2/31	1/18	0/4	3/53	83.8	27.93	5.7
11	11/28	5/24	0/6	16/58	117.9	7.37	27.6
12	15/121	1/27	0/5	16/153	109.2	6.83	10.5
Total	77/641	32/419	6/107	115/1167	1525.8	13.27	9.9
Percentage of polymorphic marker (%)	12.0	7.6	5.6				

發現以第三條染色體有 72.7%之分子標幟出現多型性最高，而第八條染色體則有 42.2%之分子標幟呈現多型性，其多型性分子標幟之比率最低，其餘染色體其多型性分子標幟呈現比率均高於 50%以上，而探勘 12 條染色體多型性分子標幟之發生比率平均則為 62.6%。

秈稻分子標幟種類的多型性之分析結果如 Table 3 所示，探勘結果顯示有 318 個分子標幟在 3 個秈稻品種間呈現多型性，分子標幟間之平均遺傳距離為 4.8 cM，其中第十二條染色體呈現最多的多型性標幟，共有 41 個，包括 36 個 SSR 標幟、3 個 indel 標幟、2 個 STS 標幟，染色體之覆蓋遺傳距離為 109.2 cM，分子標幟間之平均遺傳距離為 2.66 cM；而第九條染色體發現最少之多型性分子標幟，共有 9 個，包括 5 個 SSR 標幟、4 個 indel 標幟、而 STS 標幟則未偵測到多型性表現，染色體之覆蓋遺傳距離為 93.5 cM，兩多型性分子標幟間之平均遺傳距離為 10.39 cM，各染色體具多型性分子標幟之平均遺傳距離除第九條染色體外，其餘染色體之平均遺傳距離均在 10 cM 以下。進一步分析秈稻間分子標幟出現多型性之比率，其中以第十一條染色體之 43.1%最高，最低者為第八條染色體的 15.7%，平均比率為 27.2%。

稉稻分子標幟多型性之分析結果如 Table 4 所示，探勘結果發現有 115 個分子標幟在 3 個稉稻間具多型性，分子標幟間平均遺傳距離為 13.27cM，其中第十二條染色體發現最多之多型性分子標幟，共有 16 個，包括 15 個 SSR 標幟、1 個 indel 標幟、且 STS 標幟則未偵測到多型性表現，染色體之覆蓋遺傳距離為 109.2cM，兩分子標幟間之平均遺傳距離為 6.83cM；而第九條染色體呈現最少的多型性標幟，只有 3 個，包括 2 個 SSR 標幟、1 個 indel 標幟、但 STS 標幟則未偵測到多型性表現，染色體之覆蓋遺傳距離為 93.5cM，兩多型性分子標幟間之平均遺傳距離為 31.17cM。檢視稉稻間偵測到分子標幟呈現多型性之比率，以第十一條染色體的 27.6%最高，最低者是第一條染色體的 4.5%，而各染色體多型性分子標幟出現之平均比率為 9.9%，由上述結果可知，相較於秈稉稻與秈稻間多型性分子標幟的探勘結果，稉稻間之多型性標幟探勘仍有待進一步突破。

為了解 6 個水稻品種中具多型性的分子標幟所擴增出的不同等位基因數量資訊，將分析資料整理如 Fig. 2 所示，在 6 個水稻品種 736 個分子標幟之分析中，共 485 個分子標幟具兩個等位基因，佔 65.8%；具三個等位基因者有 179 個標幟，佔 24.3 %；具四個等位基因者有 55 個分子標幟，佔 7.4%；具五個等位基因者有 17 個標幟，僅佔 2.3% (Fig. 2a)。而就秈稻亞種內，318 個多型性標幟擴增出等位基因數目為兩個者有 264 個標幟、具三個者則有 54 個標幟，分別占 83%與 17%。在稉稻亞種內中，115 個多型性標幟擴增出的等位基因數目為兩個者，計有 105 個標幟、具三個者則有 10 個標幟，分別佔 91%與 9% (Figs. 2b, 2c)。

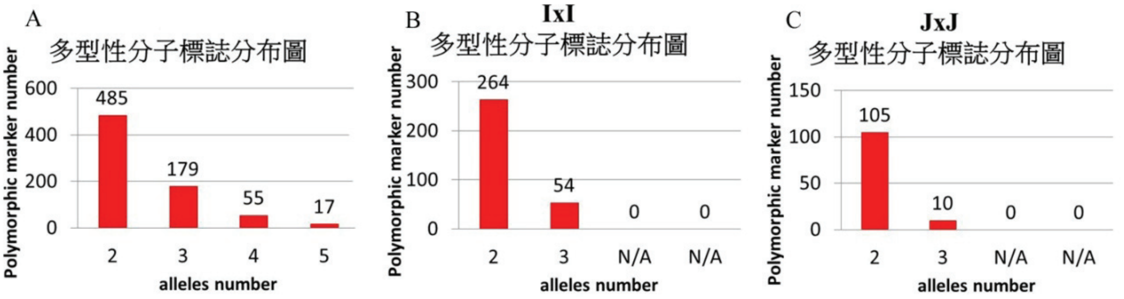


Fig. 2. The allele numbers detected by polymorphic markers. Alleles of polymorphic markers among 6 varieties (A), among 3 *indica* varieties (B), and among 3 *japonica* varieties (C) are summarized.

三、多型性分子標幟在染色體之分佈

1. 多型性分子標幟缺乏區域之探討

本研究具多型性之分子標幟共有 736 個，其中 730 個為秈稉稻間具多型性者，6 個為亞種內專一性多型性分子標幟，秈稉稻間多型性分子標幟總覆蓋遺傳距離為 1525.8 cM，多型性分子標幟平均遺傳距離為 2.09 cM。分布上有 8 個區域為多型性分子標幟較為缺乏之區域，其遺傳距離大於 10 cM，這些區域包括第一條染色體之 4.2 - 16.1 cM 與 146.4 - 157.6 cM 區域，第六條染色體之 77.75 - 89.0 cM 與 89.0 - 99.2 cM 兩區域，第七條染色體則為 25.4 - 35.7 cM 區域，第八條染色體之 3.3 - 13.35 cM 與 60.8 - 72.2 cM 區域，第九條染色體之 3.2 - 15.35 cM 等區域，除此 8 個區域外，其餘多型性分子標幟間之遺傳距離皆小於 10 cM (Fig. 3)。

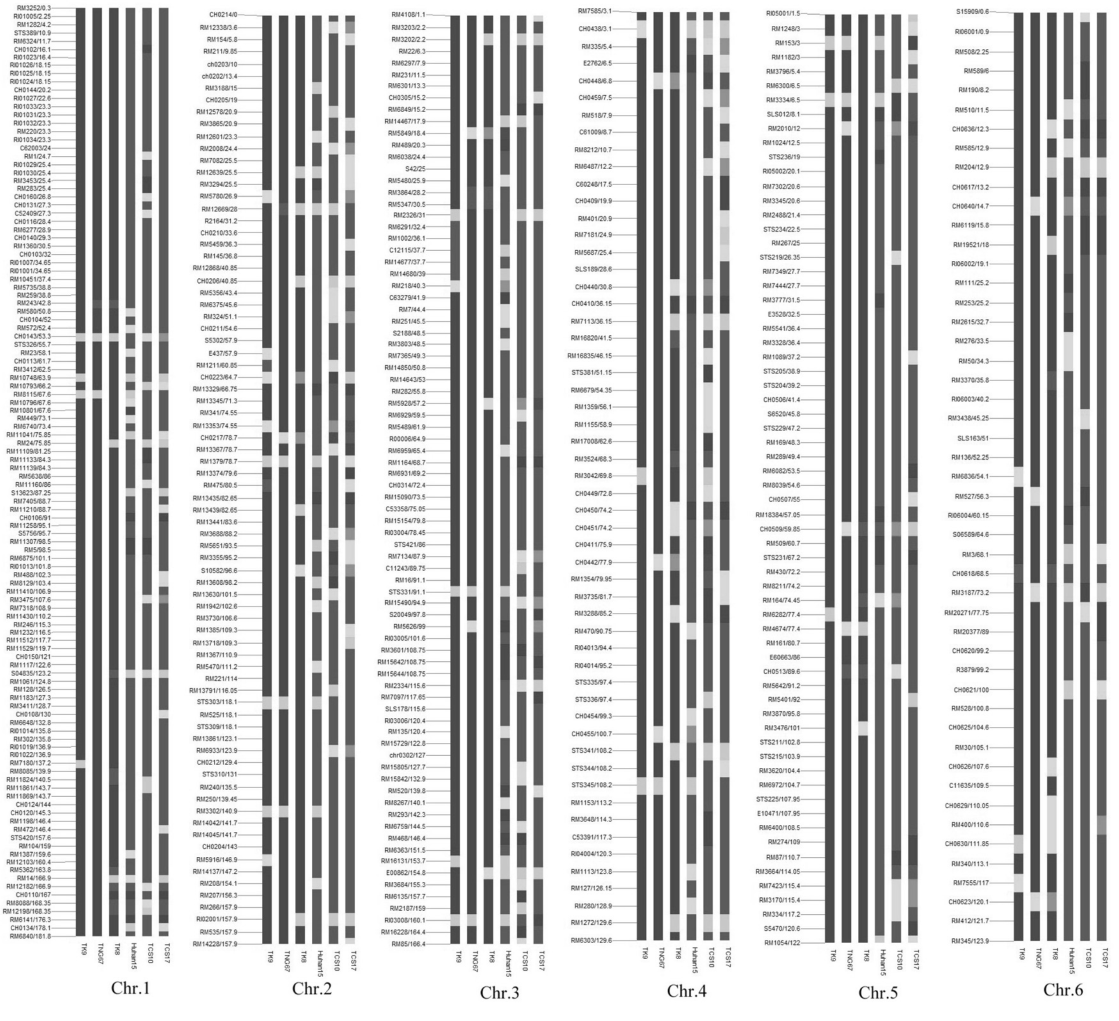
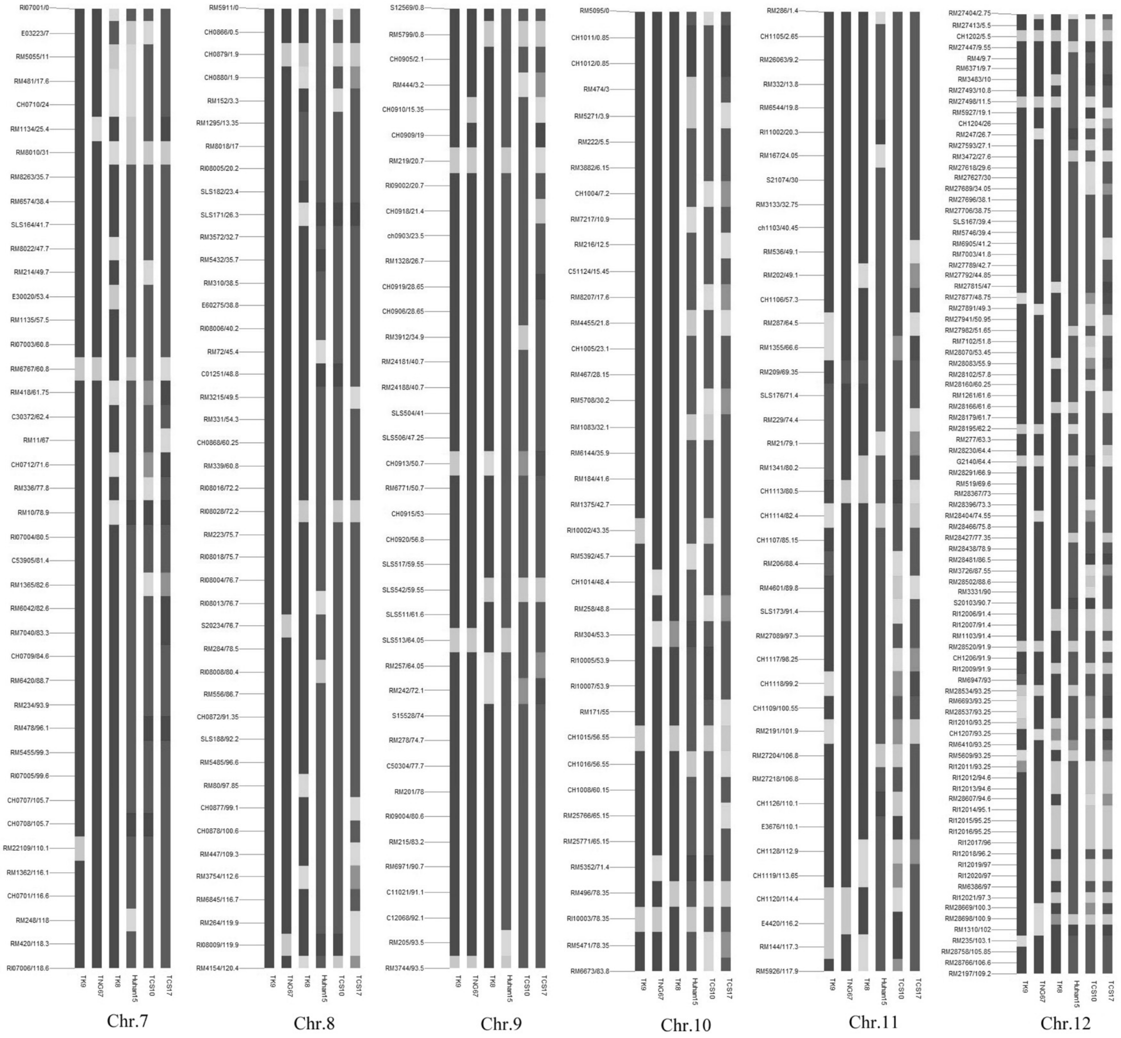


Fig. 3. Different alleles amplificated by markers within six rice varieties. (Chromosome 1- 12) In each marker, different colors were marked as different alleles between rice varieties, the same color was marked as no polymorphism between rice varieties, and it was marked by gray color if no band was amplified by markers. Marker and its relative genetic position on each chromosome was marked in the left of strip map.



Continued from Fig. 3.

秈稻間具多型性之分子標幟共有 318 個多型性分子標幟，總覆蓋之遺傳距離為 1525.8 cM，多型性分子標幟平均遺傳距離為 4.8 cM。分子標幟分佈上有 39 個區域為多型性分子標幟較為缺乏者，其遺傳距離大於 10 cM，這些區域包括第一條染色體之 5 個區域，第二、三、五和十一條染色體之 3 個區域，第四條染色體之 2 個區域，第六條染色體之 6 個區域，第七和八條染色體之 4 個區域，第九條染色體之 4 個區域，第十和十二條染色體之 1 個區域，除此 39 個位置以外，其餘多型性秈稻間分子標幟間之距離皆小於 10 cM (Fig. 3)。

稉稻間具多型性之分子標幟共有 115 個，總覆蓋遺傳距離為 1525.8 cM，多型性分子標幟平均遺傳距離為 13.27 cM，標幟分佈上有 52 個區域為多型性標幟較為缺乏者，其遺傳距離大於 10 cM，這些區域包括第一、二、三、四、六條染色體之 5 個區域，第五條染色體之 6 個區域，第七、十一和十二條染色體之 4 個區域，第八、九、十條染色體之 3 個區域，除此 52 個區域外，其餘多型性

稉稻間分子標幟間之距離皆小於 10 cM (Fig. 3)，顯示因稉稻亞種內之親緣較為接近，使得各染色體上仍有相當多之區域不易探勘發現多型性分子標幟。

2. 分子標幟間多型性差異

為方便快速尋找多型性分子標幟在此六品種間呈現的多型性差異，進一步整理出多型性分子標幟之差異結果如(Fig. 3)所示，圖中由左至右分別為臺稉 9 號(TK9)、臺農 67 號(TNG67)、臺稉 8 號 (TK8)、旱育 15 號(Hang-yu 15)、臺中秈 10 號(TCS10)，臺中秈 17 號(TCS17)。以 Fig. 3 的第一條染色體圖為例，就位於 0.3 cM 的 RM3252 分子標幟多型性結果中，臺稉 9 號、臺農 67 號、臺稉 8 號皆以紅色條帶呈現，表示此分子標幟在三個稉稻間無多型性，同時旱育 15 號、臺中秈 10 號與臺中秈 17 號皆呈現藍色條帶，表示此分子標幟在三個秈稻間也無多型性，但秈稉稻間分別有紅藍兩色之不同，顯示此分子標幟在秈稉稻間具有多型性，並顯示該分子標幟僅能於秈稻及稉稻分別可擴增出一個不同的等位基因。同理在第一條染色體上，位於 123.2 cM的S04835分子標幟在三個稉稻臺稉 9 號、臺農 67 號、臺稉 8 號分別以紅、紅、藍顏色條帶表示，結果顯示 S04835 分子標幟於臺稉 9 號與臺農 67 號間無多型性，但臺稉 9 號、臺農 67 號則與臺稉 8 號間有多型性的差異，另外在三個秈稻品種結果皆以灰色呈現，表示此分子標幟在這三個秈稻間均無法擴增出條帶，是稉稻專一多型性的分子標幟。又以 Fig. 3 的第二條染色體圖為例，位於 78.7 cM 之 CH0217 分子標幟，就多型性結果可發現除了旱育 15 號與臺中秈 17 號皆為藍色條帶外，其餘品種皆呈現不同顏色的條帶，結果顯示此分子標幟除具有秈稻及稉稻間之多型性差異外，在三個稉稻品種間亦均有多型性的差異，惟旱育 15 號與臺中秈 17 號間並無多型性，但均與臺中秈 10 號間有多型性差異存在，故此分子標幟能於此六品種間可擴增出 5 種不同的等位基因。再者，由 Fig. 3 明顯了解幾乎所有多型性分子標幟均能呈現秈稉稻亞種間差異，而秈稻亞種內次之，而稉稻亞種內之多型性相對較少。

討論

水稻品種間以 SNP 存在最多之多型性分子標幟，惟目前國內利用 SNP 進行基因型之鑑定及分析者並不普遍，分析費用不但相對較為昂貴，更需特定技術及儀器的配合方能進行，故應用性上相對於 SSR 及 indel 有較多限制。相較於 SNP，簡單序列重複標幟(SSR)之多型性原理是來自減數分裂過程中，DNA 複製時聚合酶產生失誤或同源染色體的不對稱互換，使得個體間簡單重複性序列次數發生不同。SSR 分子標幟由於同時具有共顯性、高度等位基因多樣性及易於探測等特性，故適用於進行不同水稻品種間多型性的探勘和遺傳歧異度分析工作。而本試驗先採用 SSR 分子標幟進行多型性探勘，當染色體特定區域缺乏多型性之 SSR 時，再利用插入與缺失分子標幟(indel)和標幟序列點分子標幟(STS)進一步補足該特定區域之分子標幟數目，如此便結合三種分子標幟的應用，架構高密度的多型性分子標幟平臺，提供品種鑑定、基因圖譜定位、遺傳歧異度、親緣關係及染色體組關係等探討利用。

水稻品種間多型性標幟探勘採用的電泳系統有兩種，即洋菜凝膠電泳(agarose gel electrophoresis; AGE)和聚丙烯醯胺電泳(polyacrylamide gel electrophoresis; PAGE)，兩者皆適合進行 DNA 片段的分離。在成本與效率評估方面，洋菜凝膠特點為製作方便且可重複使用，通常使用 0.3-2.0%濃度進行 0.1-60 kb 的 DNA 分子片段分離，但其缺點為不易解析片段差異較小的 DNA，甚至在使用高解析度的洋菜膠，如 SFR (Super Fine Resolution，AGAROSE SFR™) 、MetaPhor Agarose (Cambrex Bio Science Rockland) 之下，也僅能區分差異 5 bp 且大小在 250 bp 以下之條帶，但 DNA 片段大小若大於 1 kb

以上時，利用因 PAGE 系統則較不易操作及分析，以洋菜凝膠電泳系統進行分析較為合適。又經由成本評估，使用 SFR 之 AGE 分析時，平均每個樣品約需花費新臺幣 5 元，而 PAGE 每個樣品則僅需花費新臺幣 2 元，故 PAGE 能提供花費較低成本之效益。在效率方面而言，SFR 之 AGE 分析 96 個樣品需要 120 分鐘，而 PAGE 分析 96 個樣品則需要 150 分鐘，顯示兩者在分析時間效率上之差異不大，且 PAGE 系統下單片膠體即可分析 96 個樣品，而 SFR 之 AGE 系統單片膠體僅能分析 48 個樣品，故 PAGE 系統應較適合於分析大量樣品時利用。而就操作而言，PAGE 系統製程稍為繁瑣，在膠體未聚合前之聚丙烯醯胺具有神經毒性，是操作上必須注意謹慎之處。PAGE (聚丙烯醯胺凝膠)系統之優點則為能有效進行小分子量的核酸片段解析，其常用濃度為 2.5-20%，可進行 1-1000 bp 長度之 DNA 片段分析，當進行 DNA 小片段分離時，解析度可達 1-3 bp 的差異。

試驗中所使用之 indel 分子標幟是利用稉稻品種日本晴(Nipponbare)與秈稻品種 93-11 經序列比對兩者間插入、缺失位置，再設計專一性引子所得之分子標幟(Yu *et al.* 2002)。而 indel 分子標幟於水稻分布密度僅次於 SNP 及 SSR 分子標幟，故有相當高的多型性標幟數量可資運用，唯其多型性大多存在於秈稉稻亞種之間，亞種內多型性探勘效果較 SSR 分子標幟為低，故雖其在遺傳歧異度之分析效益較低，但仍不失為一個找尋秈稉稻間多型性的分子標幟系統。至於 STS 是一種辨識及複製已知圖譜位置特定 DNA 序列的分子標幟，能提供特定基因片段資訊，且 STS 能以各種分子標幟進行擴增(Yashitola *et al.* 2002)。

整體而言，秈稉稻間共使用 641 個 SSR 分子標幟，其中具多型性的分子標幟有 467 個，佔 72.9%；indel 使用 419 個分子標幟，其中具多型性的分子標幟有 214 個，佔 51.1%；STS 使用 107 個分子標幟，其中具多型性的分子標幟有 49 個，佔 45.8% (Table 2)，結果顯示三種不同分子標幟於秈稉稻間多型性比率以 SSR 的 72.9%最高，其次為 indel 的 51.1%，再者為 STS 的 45.8%。而不論在秈稻間或稉稻間三個分子標幟多型性比率結果，都與秈稉稻結果呈現一樣的趨勢，皆以 SSR 多型性比率最高，其次為 indel，再者為 STS。此外，由結果顯示秈稻間 indel 多型性分子標幟比率(16%)相較秈稉稻間(51.1%)減少許多(Tables 2, 3)，造成原因應為 indel 分子標幟是利用日本晴與 93-11 兩秈稉稻序列間插入與缺失片段比較後，進行設計發展所得之分子標幟，故可預期 indel 分子標幟在秈稻亞種內無法探勘獲得高密度的多型性標幟，故亞種間之多型性標幟仍以 SSR 分子標幟是較好的選擇。而 indel 分子標幟由於能提供秈稉稻的起源、演化與遺傳分化血緣相關訊息，仍不失為探討秈稉稻各種遺傳訊息之重要工具，而因在秈稻間多型性分子標幟密度已達 4.80 cM，應可提供在秈稻雜交分離子代遺傳圖譜建立時所需之標幟資訊。

根據稉稻間多型性分子標幟數量與密度之統計資訊(Table 4)，可分辨出稉稻間多型性的分子標幟共有 115 個，分子標幟數量以 SSR 的 77 個最多，其次為 indel 的 32 個，再者為 STS 的 6 個，分子標幟間之平均密度為 13.27 cM，相較於秈稉稻、秈稻間的分佈密度，稉稻間多型性標幟分布密度相對較低且分布不均勻，根據 Qi *et al.* (2009)收集 1950 到 1990 年間大陸優良栽培稻，利用 SSR 分子標幟進行 301 種秈稻與 211 種稉稻的遺傳差異性分析，依據其 Nei's 距離分析結果可得知稉稻間遺傳差異性比秈稻間來的低，故可預期稉稻間多型性分子標幟較不易探勘，其與本試驗結果相符。而 Jiang *et al.* (2010)進行包含 9 個稉稻的 SSR 分子標幟多型性研究中提出，稉稻間多型性很低，尤其是日本的稉稻，若能於日本當地稉稻品種間找到更多具多型性分子標幟，便可應用於到其他地區之稉稻多型性探勘工作。基此，未來若需開發

高密度之粳稻多型性標幟，對於多型性缺乏區域則需繼續設計、篩選更多 SSR 或 SNP，如此方能提高粳稻間整體多型性標幟之分佈密度。此外，在探討多型性缺乏之特定染色體方面，根據 Ni *et al.* (2002)年進行水稻亞種遺傳多樣性評估研究結果，發現兩水稻亞種在第十一條染色體上皆有最高的遺傳多樣性，與本試驗結果相符(Tables 3, 4)，且兩亞種在第五、八條染色體上之遺傳多樣性則較低，其結論與本試驗之結果亦有相同的趨勢，尤其是秈粳稻與秈稻間在第八條染色體均為多型性分子標幟比率相對低者(Tables 2, 3)。

一般而言進行基因圖譜定位選殖研究時，除須建立分離族群子代外，需要具備足量之多型性分子標幟，如此子代族群才足以進行相關標的性狀與分子標幟間之連鎖分析，特別是進行 QTL 圖譜分析時，需以小於 20 cM 且均勻分佈在染色體上的多型性分子標幟進行，如此方能找到與目標性狀具有連鎖關係之分子標幟，完成基因之初定位分析(coarse mapping)，尤其是在逐漸逼近目標基因而進行精細定位(fine mapping)時，更需要設計高密度的分子標幟，透過重組體數量及遺傳交換情形來判別基因可能存在的染色體位置，進而達到逐漸逼近基因位置的目的。因此為達到此一需求，開發及偵測具有多型性的分子標幟，乃成為基因圖譜定位重要的課題。此外，分子標幟能應用於品種純度與親緣關係鑑定之用途，Chen *et al.* (2009)指出可利用分子標幟之 DNA 指紋圖譜(DNA fingerprinting)快速、穩定且準確地鑑定品種或品系之差異，並避免環境因子干擾，更不會受到植株生育時間所限制，故分子標幟有利於對植株外表型難以區分之品種進行鑑定，對作物育種與種子管理者可提供極大的便利性及準確性，Li *et al.* (2011)則指出傳統品種鑑定所耗費時間長且成本高，且會有占用土地與應用侷限性等問題，因此隨著分子標幟的進步與發展，未來高精度的分子標幟輔助品種鑑定將會日益普及。

本研究在多型性分子標幟探勘工作上，在秈粳稻間之多型性標幟密度以達到 1 - 2.5 cM 為目標，目前多型性探勘工作共使用了 1,167 個分子標幟，其兩個分子標幟距離為 1.31 cM，其中能於 6 個品種中表現多型性的標幟共有 736 個，有 730 個為在秈粳稻間表現出多型性，而有 6 個分子標幟僅能於秈稻或粳稻間擴增出 DNA 片段，屬於亞種內專一性標幟，結果顯示所探戡發現之多型性標幟在各染色體密度已相當高，具有重要參考應用價值，尤其秈粳稻間之多型性標幟密度達平均 2.07cM，未來可利用試驗中 6 個品種間建立秈粳稻雜交分離子代，以所開發之分子標幟將可順利進行各項基因之圖譜定位工作，尤其部分染色體之多型性標幟密度低於 2.0 cM，對於基因圖譜定位研究不但已可符合基因初定位之分子標幟密度需求，甚至已達基因細定位(fine mapping)時之高密度分子標幟要求的門檻，相較於利用生物資訊學將定序結果進行序列多型性之預測，此次建立之多型性分子標幟平臺能提供較直接且準確的資訊，可不須另行針對差異片段設計引子。

由於遺傳偏離在亞種間及亞種內均普遍存在，尤其是亞種秈粳稻間會因生殖障礙(reproductive barriers)，雜種敗育(hybrid breakdown)等因素型成不同程度之遺傳偏離(Lin *et al.* 1992, Harushima *et al.* 1996, 2002,; Xu *et al.* 1997, Heuer *et al.* 2003)，致使可應用之分子標幟的數量減少，進而影響圖譜定位結果，而 Wu *et al.*(2010)指出在臺中秈 10 號、臺中秈 17 號與臺農 67 號間之秈粳稻雜交分離 F_2 子代族群中，分別有 16.8%及 11.4% 的分子標幟會出現遺傳偏離(segregation distortion)，遺傳偏離的比率較低，因此可利用臺中秈 10 號及臺中秈 17 號為親本材料，建立秈粳稻亞種間之雜交分離族群，以進行基因圖譜定位族群利用。本次試驗在秈稻品種挑選了臺中秈10號及臺中秈

17 號兩品種，有利於國內學者直接以本研究所開發之秈粳稻間多型性標幟，進行秈粳稻間之基因圖譜定位利用。

一般利用秈粳稻建立之分離族群由於生殖障礙及雜交敗育等問題，其分離子代在農藝、品質及耐逆境等數量基因控制的特性會有相當大程度之分離，因此在進行基因圖譜定位或 QTL 分析時，若無法利用大族群進行偵測基因，結果會因取樣問題數目不夠而影響分析之準確性，故若能直接以亞種內之水稻品種進行雜交分離子代之建立，如此便可減少亞種血緣差異因素所造成之影響，尤其國內主要係以粳稻育種、生產及栽培利用為主，直接利用粳稻為材料將可增加研究成果之準確性及利用性。然除秈粳稻亞種間之多型性標幟之數量及密度可滿足圖譜定位或 QTL 分析所須，內之多型性標幟之數量及密度仍然不足，其中秈稻亞種內仍有 37 個染色體位置缺乏多型性分子標幟，而粳稻亞種內更有 52 個染色體區域之多型性標幟相當缺乏 (Fig. 3)，未來仍有相當程度的努力空間。

為方便國內學者直接利用本試驗開發之多型性分子標幟資訊，將具多型性之分子標幟相關訊息整理如 Tables 5, 6 所示，藉以提供多型性分子標幟資訊諸如染色體、遺傳相對位置(cM)、分子標幟名稱與自行設計 indel 分子標幟之兩側引子序列，其中分子標幟名稱以 RM 和單一英文字表示者，其分別為 SSR 與 STS 分子標幟，其餘皆為自行設計之 indel 分子標幟。而為避免國內學者對無多型性之分子標幟進行重複探勘與分析，另將於 6 水稻品種間無法擴增出多型性片段的分子標幟列表如 Table 7 所示，避免浪費人力及資源。而筆者未來預計將加入更多材料進行多型性分子標幟之探勘工作，並持續提高多型性標幟密度，期望擴大資料的應用價值，提供足量之多型性分子標幟數量於品種鑑定、圖譜定位、染色體組關係等相關研究上利用。

Table 5. The list of polymorphic SSR and STS markers among six rice varieties.

Chr.	Marker
1	RM3252, RM12821, RM6324, RM220, C62003, RM1, RM3453, RM283, C52409, RM6277, RM1360, RM10451, RM5735, RM259, RM243, RM580, RM572, RM23, RM3412, RM10748, RM10793, RM8115, RM10796, RM10801, RM449, RM6740, RM11041, RM24, RM11109, RM11133, RM11139, RM5638, RM11160, S13623, RM7405, RM11210, RM11258, S5756, RM11307, RM5, RM6875, RM488, RM8129, RM11410, RM3475, RM7318, RM11430, RM246, RM1232, RM11512, RM11529, RM1117, S04835, RM1061, RM128, RM1183, RM3411, RM6648, RM302, RM7180, RM8085, RM11824, RM11861, RM11869, RM1198, RM472, RM104, RM1387, RM12103, RM5362, RM14, RM12182, RM8088, RM12198, RM6141, RM6840
2	RM12338, RM154, RM211, RM3188, RM12578, RM3865, RM12601, RM2008, RM7082, RM12639, RM3294, RM5780, RM12669, R2164, RM5459, RM145, RM12868, RM5356, RM6375, RM324, S5302, E437, RM1211, RM13329, RM13345, RM341, RM13353, RM13367, RM1379, RM13374, RM475, RM13435, RM13439, RM13441, RM3688, RM5651, RM3355, S10582, RM13608, RM13630, RM1942, RM3730, RM1385, RM13718, RM1367, RM5470, RM221, RM13791, RM525, RM13861, RM6933, RM240, RM250, RM3302, RM14042, RM14045, RM5916, RM14137, RM208, RM207, RM266, RM535, RM14228
3	RM4108, RM3203, RM3202, RM22, RM6297, RM231, RM6301, RM6849, RM14467, RM5849, RM489, RM6038, S42, RM5480, RM3864, RM5347, RM2326, RM6291, RM1002, C12115, RM14677, RM14680, RM218, C63279, RM7, RM251, S2188, RM3803, RM7365, RM14850, RM14643, RM282, RM5928, RM6929, RM5489, R00006, RM6959, RM1164, RM6931, RM15090, C53358, RM15154, RM7134, C11243, RM16, RM15490, S20049, RM5626, RM3601, RM15642, RM15644, RM2334, RM7097, RM135, RM15729, RM15805, RM15842, RM520, RM8267, RM293, RM6759, RM468, RM6363, RM16131, E00862, RM3684, RM6135, RM2187, RM16228, RM85
4	RM7585, RM335, E2762, RM518, C61009, RM8212, RM6487, C60248, RM401, RM7181, RM5687, RM7113, RM16820, RM16835, RM6679, RM1359, RM1155, RM17008, RM3524, RM3042, RM1354, RM3735, RM3288, RM470, RM1153, RM3648, C53391, RM1113, RM127 RM280, RM1272, RM6303

Chr.	Marker
5	RM1248, RM153, RM1182, RM3796, RM6300, RM3334, RM2010, RM1024, RM7302, RM3345, RM2488, RM267, RM7349, RM7444, RM3777, E3528, RM5541, RM3328, RM1089, S6520, RM169, RM289, RM6082, RM8039, RM18384, RM509, RM430, RM8211, RM164 , RM6282, RM4674, RM161, E60663, RM5642, RM5401, RM3870, RM3476, RM3620RM6972, E10471, RM6400, RM274, RM87, RM3664, RM7423, RM3170, RM334, S5470, RM1054
6	S15909, RM508, RM589, RM190, RM510, RM585, RM204, RM6119, RM19521, RM111RM253, RM2615, RM276, RM50, RM3370, RM3438, RM136, RM6836, RM527, S06589, RM3, RM3187, RM20271, RM20377, R3879, RM528, RM30, C11635, RM400, RM340, RM7555, RM412, RM345
7	E03223, RM5055, RM481, RM1134, RM8010, RM8263, RM6574, RM8022, RM214, E30020, RM1135, RM6767, RM418, C30372, RM11, RM336, RM10, C53905, RM1365, RM6042, RM7040, RM6420, RM234, RM478, RM5455, RM22109, RM1362, RM248, RM420,
8	RM5911, RM152, RM1295, RM8018, RM3572, RM5432, RM310, E60275, RM72, C01251, RM3215, RM483, RM331, RM339, RM223, S20234, RM284, RM556, RM5485, RM80, RM447, RM3754, RM6845, RM264, RM4153, RM4154
9	S12569, RM5799, RM444, RM219, RM1328, RM3912, RM24181, RM24188, RM6771, RM257, RM242, S15528, RM278, C50304, RM201, RM215, RM6971, C11021, C12068, RM205, RM3744
10	RM5095, RM474, RM5271, RM222, RM3882, RM7217, RM216, C51124, RM8207, RM4455, RM467, RM5708, RM1083, RM6144, RM184, RM1375, RM5392, RM258, RM304, RM171, RM25766, RM25771, RM5352, RM496, RM5471, RM6673
11	RM286, RM26063, RM332, RM6544, RM167, S21074, RM3133, RM536, RM202, RM287, RM1355, RM209, RM229, RM21, RM1341, RM206, RM4601, RM27089, RM2191, RM27204, RM27218, E3676, E4420, RM144, RM5926
12	RM27404, RM27413, RM27447, RM4, RM6371, RM3483, RM27493, RM27498, RM5927, RM247, RM27593, RM3472, RM27618, RM27627, RM27689, RM27696, RM27706, RM5746, RM6905, RM7003, RM27789, RM27792, RM27815, RM27877, RM27891, RM27941, RM27982, RM7102, RM28070, RM28083, RM28102, RM28160, RM1261, RM28166, RM28179, RM28195, RM277, RM28230, G2140, RM28291, RM519, RM28367, RM28396, RM28404, RM28466, RM28427, RM28438, RM28481, RM3726, RM28502, RM3331, S20103, RM1103, RM28520, RM28534, , RM6693, RM28537, RM6410, RM5609, RM6947, RM28607, RM6386, RM28669RM28698, RM1310, RM235, RM28758, RM28766, RM2197

Continued from Table 5.

Table 6. The list of the chromosome, position of linkage map, name and sequences for polymorphic indel markers among six rice varieties.

Chr.	cM	Marker	FORWARD PRIMER SEQUENCE	REVERSE PRIMER SEQUENCE
1	0.3-4.2	RI01005	CTCAATTTgCCCATATCTC	ATgCTgCACTgAATTTAAgAC
1	10.9	STS389	AAATCCgAgAgCTAgTTCAgT	CAACCAAACACACCTTAgATT
1	16.1	CH0102	TTCACgAAgCCTCgTTATCTC	gggTTTCgACTTTCgAACAA
1	16.4	RI01023	CCAggTCACATTgAggACg	CAgAAACTTgAggCgAAg
1	16.4-19.9	RI01026	TCAgTAggTgCAgTTggC	gAgTCATggTAgCggTAATT
1	16.4-19.9	RI01025	gTTTgAAACgCAggAATg	gACTgCTTCggTgATgg
1	16.4-19.9	RI01024	CTgCTTACACgCACAgAA	TTTCgCgTTgCTACCTT
1	20.2	CH0144	gCCCAgAgggAgTAACTTAACA	TgATATgCTggAAgCAAAACTg
1	22.6	RI01027	gAgCgggCATgTTTCTC	TCAAgCCTCgTACATCCTAT
1	22.6-24	RI01033	gAAATgAAgggAgTAgTATAggT	AgCCTgCATgTAgAATTgTCT
1	22.6-24	RI01031	TgTATTTgCAgCTTgCg	CTTgCATTTgCTCCTTATT
1	22.6-24	RI01032	TTggTTAATTTCCCTACTgC	AACCTgATgCgTgATgg
1	22.6-24	RI01034	gTAAgAATTTCCAgCAAACC	CATCATCTgAgCCACCC
1	25.4	RI01029	ATCggCggTTTgTTTAg	TTAggAgggATTgggTg
1	25.4	RI01030	ATCAgAAAgggTTCAATCTA	TggTgCCAATTACAAgC
1	26.8	CH0160	gATCggAgTATgCACAgC	gTgATCAACCgACAAAgC
1	27.3	CH0131	AgTCATgTgggAAgTCgTCTC	CATCTTACAAAgCTCCgAAT
1	28.4	CH0116	CATCCggAATTTCgAgAgAA	AgCACTAgCgCgTTCgTAAA

Chr.	cM	Marker	FORWARD PRIMER SEQUENCE	REVERSE PRIMER SEQUENCE
1	28.9-29.7	CH0140	TCTAATCTAATTggTTgCTTgC	AAATAgAAACTTgTggATggAg
1	32	CH0103	gggTTggAggAAgAgTggAT	CCCCAgAgAgTAAgAAACATCA
1	32.4-36.9	RI01007	CTACTgCTgCTgCATgTCA	ggCgATgTTCAggTggT
1	32.4-36.9	RI01001	CCAACgggATgCTCTT	ATCATgTggCACggAAT
1	52	CH0104	gATTTTgggAggAACCAgTg	ATACTTTTCCCCTgCCCATC
1	52.7-53.9	CH0143	TgCACCATTgATTgTTTATg	CCTATgCTCgTTgggTACTA
1	55.7	STS326	gCTCAgTATATTACggTggAA	gggAAgTAAATTgAATTggTT
1	60.9-62.5	CH0113	CCCAACggCACATTAAAATC	gATCCTgAggACCTgACACg
1	91	CH0106	CAgCTCCTCCTCACgCTAAT	CAggAgCCTAgTgCgAAAAg
1	101.8	RI01013	gTCTggTAAgTATTATgCCTCTg	TACACCACCAACCCTCCAT
1	121	CH0150	gAgCAAggATCAAAAgCTTAC	CTCAACTgAAAACTCCACAAAT
1	130	CH0108	TggTCCAAgCCTAAAgCCTA	ggAACggTACCACCTCAgAA
1	135.8	RI01014	TgCgATTTgTgggTTgTg	TgAAAgggCATCgTCCAg
1	136.9	RI01019	gATgCACgCTggTTgCC	TgTAgTTgggATTAgAggTCA
1	136.9	RI01022	TTggTAggCCgCACTg	ATCggTATTCTggCATCg
1	144	CH0124	AATAgAATTACTgATgAAACCTTA	gCCCgTTACCgCTTATgT
1	145.3	CH0120	gTCCACAAACgTAggCCACT	TTTCTgTAgCAACgCACAgg
1	157.6	STS420	ATTACCgACAgCAATAgTTCA	CACAggTCATACACCATCTTT
1	167	CH0110	TCTgTTTCCgTTTTgACgAA	AgCgCgTgCTgTTTTTATCT
1	178.1	CH0134	AAgAgTACAAACCgAAATCT	CAACTCTCgTTTTAAgTgTgTg
2	0	CH0214	gCATCTCgCTACCTAACCTA	gCAgTgCTAgCCTAgAAgAA
2	10	CH0203	TCCACTACggCAgAAgTTAC	CAggTTTCAAggACAgTTATg
2	13.4	CH0202	gTTgCTCTTCACACCACAgT	ACCAAAATTACCCCAAAAATA
2	19	CH0205	gAgggCCCTAggCATTACA	AgAgCTAgCTTTgCTCTCATTg
2	33.6	CH0210	CCCAgTCTgCTgCCATCT	gAATgTATTTCAgTTCCAgTAAg
2	39.6-42.1	CH0206	gTTggATTCCACTCCTTTCg	ggCATCACATgATTCTgCAA
2	54.6	CH0211	gCAgCAAAgTgCggAgTA	CAggTgAATTgCCAATTT
2	64.7	CH0223	gCTAAAgAgAAgCAATgTTCA	TCATTTACATCCATCgTTTg
2	77.8-79.6	CH0217	ATggACggTTACTTgTTgAC	TggAATCATCCTCAATTTTT
2	118.1	STS303	AgTCTggCTgAggAATAAgTT	gAgAAgAggAATAACAgAgAAg
2	118.1	STS309	CCATAACCATgACACCACTAT	TggAAgAAggACCTAAAgTCT
2	129.4	CH0212	CCTgAAggAAATgATAgCAATAg	gTTTTgTATgCTCTTCACTTgTC
2	131	STS310	TTAATTgTTgATTgTTgCTTg	TgTgCTACTgCCTACTACTCC
2	143	CH0204	TCAggAgAAAgAgAATCCCCTA	gCATTgTTTAgggCAACCAT
2	157.9	RI02001	CTgAgACggCACAACCTTA	CTCTggCTgAACCCAAATC
3	15.2	CH0305	CCATTgCTCTTCgCAAAAAT	gAgCTCCTCCgACATTggTA
3	72.4	CH0314	TgCAAgAATTAACTgCAAAA	gAACAACCACCACCATAAAT
3	76.6-80.3	RI03004	ACTCAATgTTAgCATTTCgTCT	TTTggCAACCACCgTCT
3	86	STS421	TAgATTTCTTTATCCgCTCgT	AAgAACAgAAAgAgTCgCATT
3	91.1	STS331	TgggAgTgACAACTCATCTAC	ACACCAgCAAATCAgATACAT
3	101.6	RI03005	AgACTggAACgggATCATTg	ACgTgTTgCgggCTCA
3	115.6	SLS178	AgAAgAgTTACCTCCATCCT	AggCTTCAAgTTATTgCTAA
3	120.4	RI03006	TCTTTAgCgTgggTTggg	CgTATTCTCCTCCTgTgATgC
3	127	CH0302	ACAATTATTCCCTgCAACAT	TCAAATTTgCCTgTgATgTA
3	160.1	RI03008	ACAgTTAgggAAgAAATAgCg	TCgTCTggAAACCgTgAg
4	3.1	CH0438	CCCCTAATTgCTTACATATCA	gCATCTTggAAAAgTCAAAT
4	6.8	CH0448	TTgTCTgCgTTTTCAgTATT	gATAgACAgTggCTgACTgC
4	7.1-7.9	CH0459	CggAgTCgggTATAggTAgT	AggTAATATTgCACTCTTTTT
4	19.9	CH0409	AgTgCTCggTTTTgTTTTC	gTCAgATATAATTgATggATgTA
4	28.6	SLS189	ATCAgAATATTCgggAAAAg	TTgTATACTCATTATgTAAATggA

Chr.	cM	Marker	FORWARD PRIMER SEQUENCE	REVERSE PRIMER SEQUENCE
4	30.8	CH0440	CCTAAgAgTTCAAggggAAC	gTCATATTTTCTCCCTgCAT
4	30.8-41.5	CH0410	gCTTCTCCTggTTgTATgC	AAAATAgggAggCAgATAgAC
4	49.7-52.6	STS381	TTCTTgTgAgAAATAACgCAT	TCAAATTCCAgAgTATTgCAT
4	72.8	CH0449	TAATCgCTgCTCCCTAACTA	CACACATACCCgTAACACAg
4	74.2	CH0450	CCCCTCCACTCgAATCAATg	AATCAACTCAAgCgCCAAAT
4	74.2	CH0451	AgAggAgAACCTTTTCTTgg	ACTgCTTTTgCTACTTTTgg
4	75.9	CH0411	CTTgAACCTgAgTgAgTgg	CgATgAAAATgATgTCTA
4	77.9	CH0442	CATgCAggAgATAAATTTgTAg	gAAggTgggTgTgACTCTT
4	94.4	RI04013	CCTAgTggTTAgTTACTTCCCTT	TCCCgATCCATACgATgA
4	94.4-96.0	RI04014	AAgACgggAggATCTCA	CTAgCgTTAAACCACATAAA
4	97.4	STS335	gCgAgAATgAAgAAACTTgA	ATgCATCAAATgCACACTACT
4	97.4	STS336	AACACCACTAgTAATggCAgA	ACACTACTACgCgAgACACAT
4	99.3	CH0454	TCTgCAgATgTTCCATgTAT	CCTgTTggCTAgACTTTCAg
4	100.7	CH0455	TgTggTTTgTgATTCTgATTTA	gTACACTTCACgAgTACCCCTA
4	108.2	STS341	AgTTCCTTTCCTTCACATTCT	TTgCggTAgATTTACTgTAgC
4	108.2	STS344	gTCgAgAgCAACACAATACA	TTAgATCATgATTCggAAATg
4	108.2	STS345	AAgTTTCAAgCTTTgCTTCTC	TTAgATCATgATTCggAAATg
4	120.3	RI04004	TgCTCAATgAAgCCACTCT	TTggAggTCgATTCTgCTAT
5	0.0-3.0	RI05001	gCCTgTTCAgATTgATgACA	CAAgCCTTAgCCCATTTC
5	8.1	SLS012	gCAgggCAACTCAACAATAACTT	TCgAgCTCATCgTCCTCAACATT
5	19	STS236	CATATAACTCCCTAAgCgTCA	ATAATCTTgATgATgTgACCg
5	20.1	RI05002	ACCAAACgAgCACTTgAgTT	gTggCAgCTTgTTAgAAAgA
5	22.5	STS234	gATACCTTTAATTATgTggCg	gAgATCCCTTAACTTgTCCAC
5	25.0-27.7	STS219	TCAgACCCAgTCgAATTAgTA	TgCTgAAgAATATCCCATAAg
5	38.9	STS205	CTTATCACTggTATCCTgCAC	TTTCTgACTgTAgACCAAggA
5	39.2	STS204	TgTAATCATCACAAATCACTgT	ATgTAATggATCgTATCATCg
5	41.4	CH0506	gAgAAAgAgTggAAggAg	AgTATCgTCAggAgggTC
5	47.2	STS229	AAATATgTCTTCATTggCCTT	gCAAgCAATAACAACCATAAC
5	54.6-55.4	CH0507	CTCgCTgTTTACTgACTgg	TTTgATgTACTgCCTgCTCT
5	59.0-60.7	CH0509	CgAAACACCAAAATTCTCTC	AAAgATTTTCgAAAgCAATg
5	67.2	STS231	ggATggAgggAgTAgTCAgTA	gCATCTgTTAggTTTggTATg
5	89.6	CH0513	AAACgTAACgCTTATTAACgA	AgAACgAgggTAgTACATAgT
5	102.8	STS211	TCACgCTACTCCTTTAgTTTg	ACCATCTgTTCATTgTTCAAg
5	103.9	STS215	ATTCTTCATACACTgATgCgT	ACAgAgACATggAgTTCgTC
5	107.4-108.5	STS225	CAgTACTTAAggCTgTgTTCg	gAgTACgggCCTACTTCgTC
6	0.9	RI06001	TTATCAATCTTgTggAggCg	ggTCTTggAggTTACAgggA
6	12.3	CH0636	CCTCATgCACACCAACgACA	ACCCATggAAAACTAgCA
6	12.9-13.5	CH0617	CAgTCTAgCggCATggTgT	TCCTTATCATTCgAgATTgCAC
6	14.7	CH0640	ggAAATACACgAgCCTTAAA	gAAAgTTgACCggATTTCTT
6	19.1	RI06002	CCggCATgACCAACCAg	gggATAgTCgAgAACCCTCT
6	40.2	RI06003	TCCAACgggTATAAATgC	CACTAgACTCCCTCTTgAgAA
6	51	SLS163	TgATgTgATAAAgAAgCAgA	TTTATACTCTTggTgACgTg
6	58.7-61.6	RI06004	TggCggTTCTgATgTgC	TCgggTgggTTgggTgT
6	68.5	CH0618	ATAATTTTgCCAATCCCTTC	AgACCACATAATgCgAAAAA
6	99.2	CH0620	CTCgACCTACCCCACTATT	gACgAgCAgACCAAAAgATA
6	100	CH0621	ATgCATACATCCACAgTCAA	TgATgCATAgACCgAAAgTT
6	104.6	CH0625	CTTTgTTCCATAggATAggC	CCgAgCTACTAAAgCgTCT
6	107.6	CH0626	gTgTggCAATTTAACATCCT	TTTCATCAAATATCCCCATC
6	109.5-110.6	CH0629	CCCATACCAAATggTCTAAA	gCCCTCCTCTTCATAgACTC
6	110.6-113.1	CH0630	CTTCCATTTCTTATCCTTTTTg	ggACATCTgTTTTTCgAgAT

Chr.	cM	Marker	FORWARD PRIMER SEQUENCE	REVERSE PRIMER SEQUENCE
6	120.1	CH0623	AgCCgACAACACAgTTAgAT	TAgTTTTACCTgCggTTAgC
7	0	RI07001	AAACTTggCACCTAACgC	gCTgATACTgggAATACCCTA
7	24	CH0710	gCAAATCAgTTgggTACTTC	gAgTAgCggTgTCATTTTTC
7	41.7	SLS164	CTgCATATTTTCCCCTATTA	ggACAAggCACTAATACAgT
7	60.8	RI07003	gCATTCTCCgTTCgTCA	AgCCggTgAgCTTATCC
7	71.6	CH0712	CgTggAgCTTTgAAATTATAg	AgTAAAgggCAgTATCCATC
7	80.5	RI07004	AAgggTTgggAACTTgAA	AATACCTggTCTCACCTgTC
7	84.6	CH0709	CACCATTAgAAggCCAATAg	ATCTTTTgCATgTCCTTACg
7	99.6	RI07005	ACgCATCTCATgTgACgA	TggAATgTgCCTATgTAgTg
7	105.7	CH0707	CAAgACAgCAATgAAgATCA	gAggATCATggTTCAgACAT
7	105.7	CH0708	CTTgATTTgCgAAAgAgTTT	TgACgAggATATgAATgATg
7	116.6	CH0701	CTACTgCTCCgTATTgCTgCT	gTgCCAATTACCTTCCCgTA
7	118.6	RI07006	CTTAgAgCggCAATTCAA	gCAgACAgCCATCAgAAA
8	0.5	CH0866	CTCCTTTCCCAATCTTACCT	gCgCATgCAgTATTATgTTA
8	1.9	CH0879	TAgTTgAAggAggAgAgATgg	ATTgTTTCCTCCgCCATTCC
8	1.9	CH0880	ATCCTACATgAAggTgATgC	AgCAggAAACCTAggAAATC
8	20.2	RI08005	ggCTTgACACCACCATC	TggCgTgACTggAAgg
8	21.6-25.2	SLS182	ATCCTgACCTCTTgTTCTAC	TTAACATAgAAgACCATACgC
8	26.3	SLS171	TAAATggggAAAATgTTATg	gAATCAAAATgTgTCTCAAAA
8	40.2	RI08006	TTgAgACgAgggTTTgg	gATCTgCTggCTgCTACA
8	60.1-60.4	CH0868	CAAAgTgggggCTTCATCTA	TggTCCTAATgTACCATATCATgT
8	72.2	RI08016	AAACCTggAACTCCCTCA	TTAgATgCCTCCCTATTgTC
8	72.2	RI08028	gCCCTATACTCTACCTTAAACTC	AgCCgAACTgATCgTCTT
8	75.7	RI08018	TgAACATCAACggCCAATA	CCATgTgCAAgggCTTAA
8	76.7	RI08004	CgTAAggTTgCgTAgCgg	gTAggCATgTCTTCAAATACTTCTA
8	76.7	RI08013	gCTTgATgggCTgggACT	CTgCCAgTTTgAgCTTCCTC
8	80.4	RI08008	TTTCgATTTgTTgAAggTg	TCggTggTAggTggTgT
8	90.5-92.2	CH0872	TTCTCCgTTTCATATTACAAAgAC	TgCTCTTTCCgTTTCAggTT
8	92.2	SLS188	ggCATCAgTAAgACACAATA	AATgAATCTgTCTAgATTgg
8	99.1	CH0877	AATTTgTAAgTTgCCAAggA	AATTggCAAAgAgCTgATTA
8	99.1-102.1	CH0878	TCATTTggACTTggTCTCTC	AATCgAgTTgATTgTATgTgTg
8	119.9	RI08009	TgggATgATgTTAAggTTg	TTTCTggACATgggACAA
9	2.1	CH0905	CTTTggATTCAgggggA	AACTTgAAACggAggCAg
9	10.0-20.7	CH0910	gTggTggCTgTCACTTAgAC	TCTgTCTTgCTCggTAgAAT
9	19	CH0909	gTgTTCgATAAACTgTTggAg	AATgTgAAggCATggATAATA
9	20.7	RI09002	TTTATgggACATAgggAgTAC	CTAAggCAgCTTTggAAT
9	21.4	CH0918	CAggAgCTCTTCTATTCCAA	CgTTACACCAggTAATggAT
9	23.5	CH0903	AATCTgggTACCAAATgATg	TgCAAATTgCTTAAATAggA
9	26.7-30.6	CH0919	gTgATCTTCCCCTCgTACTg	gAggAAgAgTgTgACTCTgAAT
9	26.7-30.6	CH0906	ACTgCTTTgATggCTTgTg	CTCCCCAAACTgAATCC
9	41	SLS504	AAAgACACATCAgTCgACAAC	CAAATgCCTTCACTgTACTTC
9	45.2-49.3	SLS506	ATCTCTCTAATCTTgCTggCT	TCCgTAACCCAAATAAACATA
9	50.7	CH0913	TAgTTCTCATgTgAAgAgAggA	CTATAgCTTCCTACTgggAgTg
9	50.7-55.3	CH0915	gCTACTCACACATCgAgCTA	gggTCAgCgTCTAgAATAAA
9	55.3-58.3	CH0920	TCCCTACTgTgAACATggAT	CCCATCCTgTATTgTgACTT
9	58.3-60.8	SLS517	gAgTATTgTCggTCCTCTTCT	TAgTgATAggTgATCCATCg
9	58.3-60.8	SLS542	TCAAgAATATAAgCATTCggA	TACTCCCTCTgTTCAACgATA
9	60.8-62.4	SLS511	ATCggAgAgAAgAAgAAgAgA	AACAAgCAgCgTATATCAAAC
9	63.0-65.1	SLS513	ggAATTAACTTTCCACTCgTT	TTgTTCCAATgAgCAATTAgT
9	79.1-82.1	RI09004	TTTTAgggCgTgTTCAgT	gTTgACCCgTTgACAAAT

Chr.	cM	Marker	FORWARD PRIMER SEQUENCE	REVERSE PRIMER SEQUENCE
10	0.6-1.1	CH1011	gAAAAgCTTCTTCgTgAATg	CAAAAgCCAAAgAAAgCTAC
10	0.6-1.1	CH1012	TAgTTTACCTACCCCCAgCAC	AAAgCTAgCAAAgAgAAgAAgA
10	6.8-7.6	CH1004	ATAATgTgCTgggTCTggAg	TgTgCACAggCTACCTTTCT
10	23.1	CH1005	CTgATCCATTATCAACCCTAgC	gTTTCgTCCggACTCTAgAAAA
10	42.7-44.0	RI10002	AAACCTAAgTACgCAgACAAg	gggATTTggAgggACAg
10	48.4	CH1014	TCTACCTAgCTACCgAgATAAgAAC	AATCgAATCTggATATCTTgAAA
10	53.9	RI10005	CACCCATAGAAATCTGCT	TTACGGATTCACGACTAG
10	53.9	RI10007	CGAGGTATTGTTACGGTGTT	CGGTAGTTGGCAGGTTTT
10	55.6-57.5	CH1015	TTTATACTACCATCATAATAACT	gTTgATTTgCgATTTCTACTATC
10	55.6-57.5	CH1016	AAgCgACAgCgCACgAAAC	gTTATTggCACgTggTgTg
10	58.9-61.4	CH1008	TCTgTTCAgATCTAgCCTTTTT	TAgACCTgTCCTgggggAAT
10	73.7-83.0	RI10003	CTgggATgAAggAgggC	CCgATTCggACTATgCTAT
11	2.5-2.8	CH1105	TCgTTTCCTTCAAAACCTTA	TTCggTTgAACTgATAAATgT
11	20.3	RI11002	AgAgCggACgAggATg	ggAgTTAgAAggCTATACAAAA
11	35.6-45.3	CH1103	AATAgCTTATCAAgCTgTgT	TACgTTTACCTCgAgACCAT
11	57.3	CH1106	TgTTCTCTAggggAACAAAA	ATgCCTTTTTCgTAggTgTA
11	71.4	SLS176	CAATggAATCTTgTCAgTgT	ggTATCTgTAgCAgCgTAAT
11	80.5	CH1113	TTAAACTAACCCCgTAgAgg	ATCTAATTCAggTggggAgT
11	80.5-84.3	CH1114	TCggTTTTTAATTTTgAACTCT	TTATAgAACCCTTggTAggAgA
11	84.6-85.7	CH1107	TgAgACgTTTgggAgCAT	CgATCAgCAgCAACAggT
11	91.4	SLS173	ACCCCTACCTCTACTAgTgC	CggTTTgggTgATAATATAg
11	97.3-99.2	CH1116	AAgTTCgTACATTAgCTCTCgT	CTCgAgAgTTTAgAATCCACTC
11	97.3-99.2	CH1117	TCggTAATgCATATTTCTCATA	AgCTgCgTAAgTTCAgATTACT
11	99.2	CH1118	gTTTTgTTCCTgTCCTTAAATC	ACAACACTgTCAACTgTCAAgTA
11	99.2-101.9	CH1109	AAgAAAAATATCTATTgAggAgTg	ggAggACCATAAATgACgg
11	110.1	CH1126	TTCCTTCCAgTgATCCAgTT	ATATTCTTgCTCTTCCCCgAAA
11	112.9	CH1128	TggAATTATggAAACATgTAgA	TTgTTCATATACTTggTgTgCT
11	112.9-114.4	CH1119	TTgCTTTACCTCATgAAATgTA	CggAgTTACCTACACAgCTAC
11	114.4	CH1120	TgTTgCCAgCTTACATATAgTT	CgTCTAAgCTTTgTgggTTAT
12	5.5	CH1202	CATgATCACTAgACggTgAgAC	CgCggTTCATATTATCCAgCTC
12	26	CH1204	gATCACCCATCCACATTAAC	ATAgCTAAATAAggCTgATggT
12	39.4	SLS167	gCAATAAAAACATAAAAgCA	TAAAAATATgCTgAgCAgTC
12	91.4	RI12006	ggCgATggACATCTACAATg	gCTggAgACAAggAAggAgC
12	91.4	RI12007	CTgggAgCAgACTAgCAgTA	gTTgCCTCTgATATggTgAg
12	91.9	CH1206	AAAAgCCTATgTTggACATAAT	CCATggAgCACCAAACAAAT
12	91.9	RI12009	CAgCgATTgTTCCgATTgAC	TTCATCCTCCTggTgTTCAT
12	91.9-94.6	RI12010	AgCTTTgTTCAACACCCTgAC	gTgCTCCTgATgCTgCCAAT
12	91.9-94.6	CH1207	TggTCTTgTTgTgAgAATCA	ATggCATCTgCTCAACTAAA
12	91.9-94.6	RI12011	CCACgATgTgATAgggACTT	gCgAgATCggATATggAgTA
12	94.6	RI12012	gCCATgCTCTAgCTTgTTgT	TACCgACCCACTAACCgATC
12	94.6	RI12013	ggCACCTAgCTTCCTTCCAC	AgCAAAgACAAAgACCTCCC
12	95.1	RI12014	AATCTTCTgCTgCTTgTCTg	gACTTggAATAAgCCTACgA
12	95.1-95.4	RI12015	ATCTAAACAAgCTAAgggATg	TTggTTCAAATTCgAggTCA
12	95.1-95.4	RI12016	CTgACTgggCTCgCTCTgTA	CTTgTgCCTCACCACCTTgC
12	95.4-97.0	RI12017	CTCgACATCATCCggCATCg	AggTTgTAggCAgTggTCTT
12	95.4-97.0	RI12018	AAACgTgCATACCAATggCTCA	gTgCTgCATTAAACTTTATTCAgTgAgg
12	97	RI12019	CgCggATgTATCgTAgggTg	ATATgCggCAACAgAgggAg
12	97	RI12020	CAgCCTCCATCAATTTgTgA	TCggTgTAgAgggAATAACA
12	97.3	RI12021	CCCCACATCTTCACCCTAAA	CACCAAgCAAAgACCCAgAg

Continued from Table 6.

Table 7. The list of non-polymorphic markers among six rice varieties.

Chr.	Marker
1	RM6464, RI01012, RI01018, RI01002, RM499, RI01006, RI01004, RM8069, RI01009, RI01010, CH0155, CH0156, CH0157, RI01028, RM151, CH0136, CH0139, RM3873, CH0154, RI01008, RI01003, RM1201, RI01011, RM6784, CH0146, CH0145, CH0112, RM8083, S10788, CH0141, CH0142, CH0147, S16373, CH0148, CH0149, RM8090, S20243, RM6880, RM306, RM5853, RM8144, RM9, RM2772, RM3366, CH0107, CH0127, RM84, E864, RI01017, RI01015, S15628, RI01016, RI01021, RI01020, R494, E60551, RM6117, E30008, CH0114, CH0109, S13528, RM1361, CH0128, CH0129, RM8048
2	CH0213, E3902, CH0215, RM53, E60673, RM3390, C2544, RM5179, CH0222, CH0224CH0225, C60575, RM2634, C10005, RM5363, S21164, C53493, RI02002, RI02003, RI02004, RI02005, C50485, CH0219, STS300, STS302, STS306, STS307, STS308, S20155, E11219, RM3535
3	RM60, RI03001, RI03002, E00719, E522, R10784, C60206, RI03003, S20703, CH0311, RM7249, CH0317, CH0318, CH0315, CH0316, RM1940, STS329, C60465, STS330, RM6425, RM55, RM2593, RI03007, RM143, RM422, RM6876, RM6987, RM3815, STS311, RM114
4	CH0446, CH0447, CH0457, CH0458, RM3471, RM7472, CH0408, S12020, RI04015, CH0441, RM6314, RI04001, RM471, STS319, STS385, RI04002, RM142, RM119, RM3337, RM7051, CH0443, RM252, RI04003, STS321, RI04009, RI04010, RI04011, RI04012, RM303, RM317, CH0453, STS332, RM6089, RM3217, RM5030, RM5473, S13714, STS346, STS347, RM5506, RM8276, RM131, RM124
5	SLS013, SLS112, STS232, RM2585, STS238, RM3853, STS224, STS201, RM5994, EA0155, STS209, CH0524, RM6724, CH0525, RM18351, CH0522, CH0523, RM5705, SLS046, CH0508, RM7363, STS230, RM3969, E10886, SLS140, RI05003, RM3663, RM3575, CH0512, C903, RM6054, CH0514, CH0515, RI05004, RM5970, STS210, E30531, E31762, RM2357, RM480, RI05005, RM3068, CH0510, CH0511
6	S00310, E30287, S2107, RM170, CH0616, CH0639, RM6734, RM2126, RM121, RM7583, RM541, CH0619, CH0631, CH0632, CH0633, CH0634, STS426, RI06005, S20734, C50105, SLS191, SLS192, SLS208, SLS187, RM7579, STS350, STS430, SLS193, RM2062, CH0610, CH0624, CH0627, CH0622, RM103, RM141
7	RM295, E61991, E61774, CH0711, ch0704, ch0703, RI07002, RM125, SLS165, E11222, E10534, RM1973, CH0713, RM70, RM3589, RM1209, RM1364, CH0706, RM2715, RM2789
8	RM337, CH0882, RM38, SLS166, RM5428, RM544, S1461, E61149, RM8019, RM404, S20045, RI08007, CH0869, E00912, RM8264, RI08014, RI08015, RM515, RI08034, RI08035, RI08033, RI08036, RI08022, RI08029, RI08030, RI08023, RI08031, RI08017, RI08024, RI08025, RI08003, RI08001, RI08002, RI08010, RI08019, RI08020, RI08032, RI08011, RI08026, RI08027, RI08021, RI08012, CH0870, CH0871, CH0873, CH0874, CH0875, CH0876, RM149, SLS183, CH0862, RM230, R02118, RM4487, E4443, RM281, C01346
9	RI09001, RM8206, CH0911, RM1817, RI09003, SLS505, S00548, CH0921, SLS510, CH0917, E20107
10	CH1002, RI10001, CH1006, RM5147, C00011, RM5304, RM2433, RM1937, RM6150, C63320, RI10004, RI10006, CH1009, E30802, RM6016
11	RI11001, R02918, RM116, RM3625, RI11003, RM479, RM3721, RI11004, SLS181, CH1110, C50759,C10775, CH1115, CH1127, RM224, RM4844
12	RI12001, RM27423, RM27427, RM415, C62896, RI12002, RM453, RM27557, RM27567, RM117, RM27602, RM491, RM27611, CH1201, RM3455, RM27709, RM512, RM27724, RM27731, C60015, RM2529, RM27825, RM101, RM27929, RM27936, RM28002, RM28073, RM28107, RM28130, RM465, RI12003, RM511, RM28238, RM5341, RM1246, RM28275, RM28283, RM28295, RM28313, RM28339, RM28347

引用文獻

Akkaya MS, AA Bhagwat, PB Cregan (1992) Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics** 132:1131-1139.

Ali ML, PL Sanchez, SB Yu, M Lorieux, C Eizenga (2010) Chromosome segment substitution lines: a powerful tool for the cultivated rice (*O. sativa*). **Rice** 3:218-234.

Botstein D, RL White, M Skolnick, RW Davis (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **Amer. J. Hum. Genet.** 32:314- 331.

Chen YH, YM Hou, HY Li, Y Yuan, CC Hsu (2009) Establishment of DNA Fingerprinting and Analysis of Genetic Diversity Among Japonica Rice Cultivars Attended Regional Trials in Northeast Region of China. **Seed** 28:28-35.

Collard BCY, MZZ Jahufer, JB Brouwer, ECK Pang (2005) An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. **Euphytica** 142:169-196.

Harushima Y, N Kuratam, M Yano (1996) Detection of segregation distortions in an *indica-japonica* rice cross using a high-resolution molecular map. **Theor. Appl. Genet.** 92:145-150.

Harushima Y, M Nakagahra, M Yano (2002) Diverse variation of reproductive barriers in three intraspecific rice crosses. **Genetics** 160: 313-322.

Heuer S, KMM Zan (2003) Assessing hybrid sterility in *Oryza glaberrima O. sativa* hybrid progenies by PCR marker analysis and crossing with wide compatibility varieties. **Theor. Appl. Genet.** 107: 902 - 909.

Huang M, FM Xie, LY Chen, XQ Zhao, L Jojee, D. Madonna (2010) Comparative analysis of genetic diversity and structure in rice using ILP and SSR markers. **Rice Sci.** 17:257-268.

IRRI (1996) Drought Sensitivity. p.37-38. *In*: Standard Evaluation System for Rice. IRRI, Los Banos, Philippines.

International rice genome sequencing project (2005) The map-based sequence of the rice genome. **Nature** 436:793-800.

Jiang SK, C Huang, XJ Zhang, JY Wang, WF Chen, ZJ Xu (2010) Development of a highly informative microsatellite (SSR) marker framework for rice (*Oryza sativa L.*) genotyping. **Agric. Sci. China** 9:1697-1704.

Kazuhiro K, Y Niwa, T Yamaguchi, H Sunohara, H Hirano, M Umeda (1998) A rapid and easy-handling procedure for isolation of DNA from rice, *Arabidopsis* and tobacco. **Plant Biotechnol.** 15:45-48.

Kikuchi K, Y Niwa, T Yamaguchi, H Sunohara, HY Hirano, M Umeda (1998) A rapid and easy-handling procedure for isolation of DNA from rice, *Arabidopsis* and tobacco. **Plant Biotech.** 15:45-48.

Kruglyak L, DA Nickerson (2001) Variation is the spice of life. **Nat. Genet.** 27:234-236.

Li MB, H Wang, JJ Po, JJ Pu (2011) The research progress of using SSR markers to construct rice variety DNA fingerprinting. **China Rice** 17:4-6.

Lin SY, H Ikehash, S Yanagihara (1992) Segregation distortion via male gametes in hybrids between *indica* and *japonica* or wide-compatibility varieties of rice (*Oryza sativa* L). **Theor. Appl. Genet.** 84:812-818.

Lin YR, YP Wu, FJ Wei, PC Lu, YC Huang, CH Chang, AL Hour, SC Kuo, JS Hsieh, YI Hsing (2008) Construction of the website 'The resource of rice genetic markers in Taiwan'. (in Chinese with English abstract) **Crop Environ. Bioinforma.** 5: 1-21.

Lu BR, XX Cai, X Jin (2009) Efficient *indica* and *japonica* rice identification based on the InDel molecular method: its implication in rice breeding and evolutionary research. **Progress Nat. Sci.** 19:1241-1252.

Luo LJ (2010) Breeding for water-saving and drought-resistance rice (WDR) in china. **J. Exp. Bot.** 61:3509-3517.

McCouch SR, G Kochert, ZH Yu, ZY Wang, GS Khush, WR Coffman, SD Tanksley (1988) Molecular mapping of rice chromosomes. **Theor. Appl. Genet.** 76:815-829.

McCouch SR, XL Chen, O Panaud, S Temnykh, YB Xu, YG Cho, N Huang, T Ishii, M Blair (1997) Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. **Plant Mol. Biol.** 35:89-99.

Ni J, PM Colowit, DJ Mackill (2002) Evaluation of genetic diversity in rice subspecies using microsatellite markers. **Crop Sci.** 42:601-607.

Olson M, L Hood, C Cantor, D Botstein (1989) A common language for physical mapping of the human genome. **Science** 245:1434-1435.

Paterson AH, ES Lander, JD Hewitt, S Peterson, SE Lincoln, SD Tanksley (1988) Resolution of quantitative traits into mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. **Nature** 335: 721-726.

Qi YW, HL Zhang, DL Zhang, MX Wang, JL Sun, L Ding, FH Wang, ZC Li (2009) Assessing *indica-japonica* differentiation of improved rice varieties using microsatellite markers. **J. Genet. Genomics** 36:305-312.

Rafalski JA, SV Tingey (1993) RFLP map of soybean (*Glycine max*) 2N=40. p.149-156. *In*: Genetic maps. SJ O'Brien (Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.

Ribaut JM, D Hoisingtion (1998) Marker-assisted selection: new tools and strategies. **Trends Plant Sci.** 3:236-239.

Shen YJ, H Jiang, JP Jin, ZB Zhang, B Xi, YY He, G Wang, C Wang, L Qian, X Li, Q B Yu, HJ Liu, DH Chen, JH Gao, H Huang, TL Shi, ZN Yang (2004) Development of genome-wide DNA polymorphism database for map-based cloning of rice genes. **Plant Physiol.** 135:1198-1205.

Shimizu A, S Kawasaki (2009) Rapid construction of a high-density rice linkage map by high efficiency genome scanning (HEGS) system. **Rice sci.** 16:247-253.

Vos P, R Hogers, M Bleeker, M Reijans, TVD Lee, M Hornes, A Frijters, J Pot, J Peleman, M Kuiper, M Zabeau (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Res.** 23:4407-4414.

Williams, JGK, AR Kubelik, KJ Livak, JA Rafalski, SV Tingey (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.** 18:6531-6535.

Wu YP, PY Ko, WC Lee, FJ Wei, SC Kuo, SW Ho, AL Hour, YI Hsing, YR Lin (2010) Comparative analyses of linkage maps and segregation distortion of two F_2 populations derived from *japonica* crossed with *indica* rice. **Hereditas** 147: 225-236.

Xu Y, L Zhu, J Xiao (1997) Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F_2 , backcross, double haploid, and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa* L.). **Mol. Gen. Genet.** 253: 535-545.

Yashitola J, T Thirumurugan, RM Sundaram, MK Naseerullah, MS Ramesha, NP Sarma, RV Sonti (2002) Assessment of purity of rice hybrids using microsatellite and STS markers. **Crop Sci.** 42:1369-1373.

Yu J, S Hu, J Wang, GK Wong, S Li, B Liu, Y Deng, L Dai, Y Zhou, X Zhang (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. spp. *indica*). **Science** 296:79-92.

－編輯：楊純明